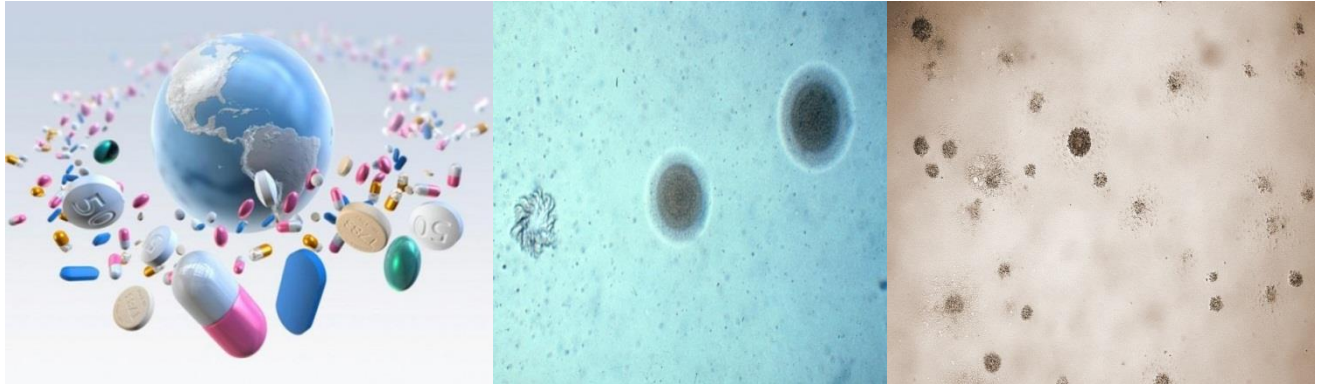


**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”  
CENTRO DE INVESTIGACIONES, DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA  
DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA-MICOLOGÍA**



**RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS DE *Ureaplasma* spp. y *Mycoplasma pneumoniae*,  
CUBA (2012 – 2018)**

**Tesis presentada en opción al Grado Científico de  
Doctor en Ciencias de la Salud**

**NADIA MARÍA RODRÍGUEZ PREVAL**

**La Habana, 2021**

**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”  
CENTRO DE INVESTIGACIONES, DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA  
DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA-MICOLOGÍA**

**RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS DE *Ureaplasma* spp. y *Mycoplasma pneumoniae*,  
CUBA (2012 – 2018)**

**Tesis presentada en opción al Grado Científico de  
Doctor en Ciencias de la Salud**

**Autor: Lic. NADIA MARÍA RODRÍGUEZ PREVAL. M. Sc.**

**Tutores:** Lic. Gilda Toraño Peraza, Dr. C.

Dra. Carmen Fernández Molina, Dr. C.

**Asesores:** Dr. Roger Dumke, Dr. C.

Dr. Brad Spiller, Dr. C.

**La Habana, 2021**

*A mi abuelo*

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas aquellas personas que con su apoyo, su colaboración paciente y desinteresada permitieron realizar el conjunto de investigaciones que hoy constituyen esta tesis de doctorado. Agradecer en especial a mis tutoras y asesores por participar activamente en mi formación profesional y personal. En especial a la Dra. Gilda Toraño por aceptar la tutoría de este trabajo, por convertirla a la fuerza en una experta en micoplasmas, y a la que ya le he invadido hasta su laboratorio. A la Dra Carmen Fernández, la jefecita, por haberme involucrado desde muy temprano en el mundo de la micoplasmología, y que tanto me ha enseñado como profesional y como persona; a mis compañeros del departamento, en especial a Islay y Angel, que siempre estuvieron dispuestos para ayudarme en lo que necesitara.

No podría dejar de agradecer a mi familia, mis primas, tíos, todos pendientes de cada paso en este largo recorrido, a mis padres, a los cuales agradezco por impulsarme a convertirme en la persona que soy hoy, a mi compañero de vida, Jorgito, y a mi pequeño Jorge Adrián, que ya perdió la cuenta de las predefensas que tuve que hacer, y agradece hoy que ya su mamá termina el doctorado.

En fin, a todos... infinitas gracias.

## LISTADO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

|                 |  |                |  |
|-----------------|--|----------------|--|
| <b>ADN</b>      | Ácido desoxirribonucleico  | <b>LNR-M</b>   | Laboratorio Nacional de Referencia de Micoplasmas                            |
| <b>ARNr</b>     | Ácido ribonucleico ribosomal   | <b>MBA</b>     | Siglas en inglés de Antígeno de múltiples bandas                             |
| <b>ARNr 16S</b> | Subunidad 16S del ARNr   | <b>Minsap</b>  | Ministerio de Salud Pública  |
| <b>ARNr 23S</b> | Subunidad 23S del ARNr   | <b>MLSK</b>    | Macrólidos, lincosamidas, estreptograminas y ketólidos                       |
| <b>ATCC</b>     | Colección Americana de Cultivos Tipo                                 | <b>MLST</b>    | Siglas en inglés de Secuencias tipos en múltiples <i>locus</i>               |
| <b>ATP</b>      | Siglas en inglés de Trifosfato de adenosina                          | <b>MLVA</b>    | Siglas en inglés de Análisis de las variaciones en múltiples <i>locus</i>    |
| <b>CARDS:</b>   | Síndrome de distrés respiratorio adquirido en la comunidad           | <b>NBAC</b>    | Neumonía bacteriana adquirida en la comunidad                                |
| <b>CC</b>       | Complejo clonal  | <b>PCR</b>     | Siglas en inglés de Reacción en cadena de la polimerasa                      |
| <b>CLSI</b>     | Siglas en inglés del Instituto de Estándares Clínicos de Laboratorio | <b>PFGE</b>    | Siglas en inglés de Electroforesis en gel en campo pulsado                   |
| <b>CMI</b>      | Concentración mínima inhibitoria                                     | <b>RT-PCR</b>  | Siglas en inglés de PCR en tiempo real                                       |
| <b>Ct</b>       | Ciclo umbral   | <b>ST</b>      | Secuencia tipo   |
| <b>dNTP</b>     | Deoxinucleótidos trifosfato  | <b>tet (M)</b> | Gen que codifica la proteína Tet (M)   |
| <b>ELISA</b>    | Siglas en inglés de Ensayos inmunoenzimáticos sobre fase sólida      | <b>UCC</b>     | Unidad cambiadora de color   |
| <b>HAN</b>      | Hibridación de Ácidos Nucleicos                                      | <b>UFC</b>     | Unidad formadora de colonia  |
| <b>HRM</b>      | Siglas en inglés de Análisis de alta resolución                      | <b>UNG</b>     | Uretritis no gonocócica  |
| <b>IPK</b>      | Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”                         | <b>VNTR</b>    | Siglas en inglés de Variaciones del número de secuencias repetidas en tandas |
| <b>IRA</b>      | Infección Respiratoria Aguda   |                |  |
| <b>ITS</b>      | Infecciones de transmisión sexual                                    |                |  |

## SÍNTESIS

Se describe la frecuencia de aislados cubanos de *Ureaplasma* spp. y *Mycoplasma pneumoniae* resistentes a los antimicrobianos de elección para el tratamiento y los mecanismos de resistencia implicados. Se muestran los resultados de una investigación descriptiva realizada en el Laboratorio Nacional de Referencia de Micoplasmas, Instituto “Pedro Kourí” (2012 – 2018). Se incluyeron 21 aislados y 19 muestras clínicas positivas para *M. pneumoniae* y 262 aislados de *Ureaplasma* spp. Se emplearon los métodos de referencia para la determinación de la susceptibilidad a los antimicrobianos y la genotipificación molecular. La resistencia a macrólidos fue más frecuente en *M. pneumoniae* (22,5 %) que en *Ureaplasma* spp. (1,5 %), donde además se demostró resistencia a tetraciclina (1,5 %) mediada por el gen *tet(M)*; este también se identificó en dos aislados susceptibles. Para *M. pneumoniae* se informan mutaciones puntuales en el ARNr 23S relacionadas con la resistencia a macrólidos y se constató diversidad genética. A partir de la susceptibilidad antimicrobiana de *Ureaplasma* spp. y *M. pneumoniae* y de la detección de los determinantes genéticos implicados, se alerta sobre un problema poco conocido hasta el momento en el país y se aportan elementos para la construcción de una línea base útil para estudios futuros.

## ÍNDICE

|   | <b>Pág.</b> |
|---|-------------|
| <b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>   | <b>1</b>    |
| 1.1. Hipótesis.....   | 8           |
| 1.2. Objetivos.....   | 8           |
| 1.3. Novedad Científica y valor práctico y teórico de la tesis.....                                   | 9           |
| <b>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>  | <b>11</b>   |
| 2.1. Generalidades.....   | 12          |
| 2.2. <i>M. pneumoniae</i> .....   | 13          |
| 2.2.1. Patogénesis de <i>M. pneumoniae</i> .....  | 14          |
| 2.2.2. Epidemiología de las infecciones por <i>M. pneumoniae</i> .....                                | 16          |
| 2.3. <i>Ureaplasma</i> spp.....   | 17          |
| 2.3.1. Patogénesis de <i>Ureaplasma</i> spp.....  | 18          |
| 2.3.2. Epidemiología de las infecciones por <i>Ureaplasma</i> spp.....                                | 19          |
| 2.4. Métodos para el diagnóstico microbiológico de las infecciones por micoplasmas y ureaplasmas..... | 20          |
| 2.4.1. Diagnóstico convencional.....  | 21          |
| 2.4.1a. Cultivo bacteriológico.....   | 21          |
| 2.4.1b. Pruebas bioquímicas.....  | 23          |
| 2.4.1c. Métodos serológicos.....  | 24          |
| 2.4.2. Diagnóstico Molecular.....   | 24          |
| 2.5. Tratamiento antimicrobiano de las infecciones por micoplasmas y ureaplasmas.....                 | 26          |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.5.1. Resistencia de micoplasmas y ureaplasmas a los antimicrobianos de elección para el tratamiento de las infecciones que producen.....          | 27        |
| 2.5.1a. Resistencia intrínseca.....   | 27        |
| 2.5.1b. Resistencia adquirida.....  | 27        |
| 2.6. Métodos de determinación de la susceptibilidad de aislados de micoplasmas y ureaplasmas a los antimicrobianos.....                             | 29        |
| 2.7. Caracterización molecular de micoplasmas y ureaplasmas.....  | 31        |
| 2.7.1. Métodos moleculares para la genotipificación de <i>M. pneumoniae</i> ...   | 31        |
| 2.7.1a. Métodos basados en el análisis de la proteína P1.....   | 31        |
| 2.7.1b. Métodos basados en el análisis de las variaciones del número de secuencias repetidas en tandas (VNTR) en múltiples <i>locus</i> (MLVA)..... | 33        |
| 2.7.1c. Métodos basados en el análisis de secuencias tipos en múltiples <i>locus</i> (MLST).....  | 33        |
| 2.7.2. Métodos moleculares para la genotipificación de <i>Ureaplasma</i> spp.   | 34        |
| <b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>   | <b>36</b> |
| 3.1. Diseño general de la investigación.....  | 37        |
| 3.2. Material biológico.....  | 37        |
| 3.3. Determinación de los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de aislados cubanos de <i>Ureaplasma</i> spp. y <i>M. pneumoniae</i> .....     | 40        |
| 3.3.1. Determinación de los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de <i>Ureaplasma</i> spp.....  | 40        |
| 3.3.1a. Perfil de susceptibilidad de los aislados de <i>Ureaplasma</i> spp..  | 40        |



|  |    |
|--|----|
| 3.3.1b. Perfil de susceptibilidad de <i>Ureaplasma</i> spp. inferido a partir de estudio de muestras clínicas.....   | 44 |
| 3.3.1c. Identificación de las especies de <i>Ureaplasma</i> a partir de las muestras informadas positivas por medio del estuche MYCO WELL D-ONE.....                         | 46 |
| 3.3.1d. Confirmación de la resistencia antimicrobiana de los aislados recuperados a partir de las muestras informadas resistentes por medio del estuche MYCO WELL D-ONE..... | 47 |
| 3.3.2. Determinación de los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados de <i>M. pneumoniae</i> .....   | 47 |
| 3.4. Demostración de los mecanismos moleculares asociados a la resistencia a tetraciclina y macrólidos en <i>Ureaplasma</i> spp. y <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .....        | 50 |
| 3.4.1. Detección del gen <i>tet(M)</i> en aislados de <i>Ureaplasma</i> spp.....   | 50 |
| 3.4.2. Detección de determinantes genéticos de resistencia a macrólidos.....   | 51 |
| 3.4.2a. Detección de las mutaciones específicas que confieren resistencia a macrólidos en <i>Ureaplasma</i> spp.....   | 51 |
| 3.4.2b. Detección de las mutaciones específicas que confieren resistencia a macrólidos en <i>M. pneumoniae</i> .....   | 53 |
| 3.5. Detección de genotipos de <i>M. pneumoniae</i> .....  | 55 |
| 3.5.1. Determinación de genotipos mediante análisis de la proteína de adhesión P1.....   | 55 |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.5.1a. PCRs anidadas para la amplificación de fragmentos del elemento repMp2/3 del gen de la proteína P1 de <i>M. pneumoniae</i> .....  | 55        |
| 3.5.1b. PCR anidada para la amplificación de fragmentos del elemento repMp4 del gen de la proteína P1 de <i>M. pneumoniae</i> .....  | 56        |
| 3.5.1c. Secuenciación y análisis de los resultados.....  | 57        |
| 3.5.2. Determinación de genotipos mediante el análisis de las variaciones del número de secuencias repetidas en tandas (VNTR) en múltiples <i>locus</i> (MLVA) de <i>M. pneumoniae</i> ..... | 57        |
| 3.5.2a. PCRs anidadas para la amplificación de cuatro <i>locus</i> de <i>M. pneumoniae</i> .....   | 57        |
| 3.5.2b. Secuenciación y análisis de los resultados.....  | 58        |
| 3.5.3. Determinación de genotipos mediante el análisis de las secuencias tipos en múltiples <i>locus</i> (MLST) de <i>M. pneumoniae</i> .....  | 58        |
| 3.5.3a. PCRs simples para la amplificación de los genes constitutivos de <i>M. pneumoniae</i> seleccionados para el análisis.....  | 59        |
| 3.5.3b. Secuenciación y análisis de los resultados.....  | 59        |
| 3.5.3c. Análisis filogenético.....   | 59        |
| 3.6. Aspectos éticos de la investigación.....  | 60        |
| <b>IV. RESULTADOS</b> .....  | <b>61</b> |
| 4.1. Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de aislados cubanos de <i>Ureaplasma</i> spp. y <i>M. pneumoniae</i> .....   | 62        |
| 4.1.1. Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de <i>Ureaplasma</i> spp.....  | 62        |
| 4.1.1a. Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de aislados de  |           |

|  |           |
|--|-----------|
| <i>Ureaplasma</i> spp.....   | 62        |
| 4.1.1b. Perfil de susceptibilidad de <i>Ureaplasma</i> spp. a partir de las muestras clínicas.....   | 63        |
| 4.1.1c. Confirmación de la resistencia antimicrobiana de los aislados recuperados a partir de las muestras informadas resistentes por medio del estuche MYCO WELL D-ONE..... | 65        |
| 4.1.2. Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de aislados de <i>M. pneumoniae</i> .....  | 66        |
| 4.2. Demostración de los mecanismos moleculares asociados a la resistencia a tetraciclina y macrólidos en <i>Ureaplasma</i> spp. y <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .....        | 67        |
| 4.2.1. Detección del gen <i>tet</i> (M) en aislados de <i>Ureaplasma</i> spp.....  | 67        |
| 4.2.2. Detección de mutaciones específicas en <i>Ureaplasma</i> spp. que confieren resistencia a macrólidos.....   | 67        |
| 4.2.3. Detección de mutaciones específicas en <i>M. pneumoniae</i> que confieren resistencia a macrólidos.....   | 68        |
| 4.3. Detección de genotipos de <i>M. pneumoniae</i> .....  | 69        |
| <b>V. DISCUSIÓN.....</b>   | <b>74</b> |
| 5.1. Susceptibilidad antimicrobiana de aislados cubanos de <i>Ureaplasma</i> spp...  | 75        |
| 5.2. Susceptibilidad antimicrobiana de aislados cubanos de <i>M. pneumoniae</i> .....  | 85        |
| 5.3. Discusión general.....  | 92        |
| 5.3.1. Limitaciones y fortalezas del estudio.....  | 94        |
| <b>CONCLUSIONES.....</b>   | <b>96</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>RECOMENDACIONES.....</b>            | <b>98</b>  |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b> | <b>100</b> |

## **ANEXOS**

Anexo 1. Secuencia de los cebadores y sondas utilizados durante el estudio para la determinación de la susceptibilidad a antimicrobianos de aislados cubanos de *Ureaplasma* spp. y *Mycoplasma pneumoniae*, 2012-2018.

Anexo 2. Características de los *locus* empleados en la genotipificación de *Mycoplasma pneumoniae* mediante MLVA y MLST.

Anexo 3. Subtipos P1, genotipos MLVA y Secuencias Tipo por MLST de *M. pneumoniae*, LNR-M, Cuba, 2012 y 2017.

**PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR SOBRE EL TEMA DE LA TESIS**  
**PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DEL AUTOR NO RELACIONADAS CON**  
**EL TEMA DE LA TESIS**

# **I. INTRODUCCIÓN**

## I. INTRODUCCIÓN

Las diferentes especies de los géneros *Mycoplasma* y *Ureaplasma*, ambos de la clase *Mollicutes* y conocidos comúnmente como micoplasmas, son las bacterias más pequeñas conocidas hasta el día de hoy. La carencia de pared celular, su pequeño genoma y las capacidades limitadas de biosíntesis explican su estilo de vida saprófita, su sensibilidad a los factores ambientales y la resistencia a los antimicrobianos. Entre las más de 260 especies de micoplasmas descritas en el reino animal y las plantas, solo algunas tienen importancia clínica en individuos inmunocompetentes; entre ellas *Mycoplasma pneumoniae*, que es causa de infecciones respiratorias, así como *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum*, asociadas a infecciones del tracto genital (Taylor-Robinson D, 2017).

En el género *Ureaplasma* se incluyen las bacterias más pequeñas capaces de autorreplicarse y parasitar al hombre. Como su nombre lo sugiere, utilizan la urea como fuente primaria de carbono para la generación de trifosfato de adenosina (ATP, siglas en inglés de *adenosine triphosphate*) (Smith DG *et al.*, 1993). Dentro de este género, las especies de interés médico son *U. parvum* y *U. urealyticum*. Ambas tienen una historia controversial como patógenos pues se reconocen también como colonizadores del tracto urogenital en individuos sanos; por ejemplo, se demuestran entre el 40 y 80 % de las mujeres sanas. Sin embargo, se describen como patógenos en embarazadas, neonatos y pacientes inmunocomprometidos (Zhang N *et al.*, 2014; Bartkeviciene D *et al.*, 2020; Silwedel Ch *et al.*, 2021).

El tratamiento de las infecciones por *Ureaplasma* spp. es complicado debido a su resistencia intrínseca a muchos de los antimicrobianos prescritos comúnmente. La ausencia de pared celular les confiere resistencia a todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y glicopéptidos, mientras que la incapacidad de síntesis de ácido fólico los hace resistentes a las sulfonamidas y

diamonipirimidinas; además son resistentes de forma intrínseca a las lincosamidas (Schneider SC *et al.*, 2015). Solo las fluoroquinolonas, tetraciclinas y macrólidos resultan eficaces para el tratamiento; sin embargo, también para estos antimicrobianos se describen mecanismos de resistencia dentro del género *Ureaplasma* (Beeton ML y Spiller OB, 2016).

La acumulación de mutaciones puntuales en los genes del ARNr 23S y las regiones determinantes de resistencia a quinolonas del gen *parC* son los mecanismos predominantes de resistencia adquirida a macrólidos y fluoroquinolonas, respectivamente. La resistencia adquirida a tetraciclinas se asocia con la adquisición del gen que codifica la proteína de protección ribosomal Tet(M), que se encuentra en el transposón Tn916 (Marissa A *et al.*, 2017; Meygret A *et al.*, 2018).

Según destaca el Comité Editorial de las Guías Europeas para las Infecciones de Transmisión Sexual (ITS) en el año 2018, el diagnóstico y tratamiento de las infecciones por *Ureaplasma* spp. puede resultar en la selección de resistencia a los antimicrobianos. Atendiendo a que las evidencias disponibles para considerar estas especies como agentes etiológicos de ITS y de complicaciones, tanto en los hombres como en las mujeres, aún se cuestionan y no se recomienda su diagnóstico. Por otra parte, no existen datos que demuestren con robustez que el tratamiento antimicrobiano erradique estas infecciones y que su persistencia se asocie con la permanencia de signos y síntomas (Horner P *et al.*, 2018).

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para *Ureaplasma* spp. no se realizan de rutina. Waites KB y colaboradores en el 2001 recomiendan por primera vez una metodología para este propósito, pero no es hasta el año 2011 que el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios de Estados Unidos (CLSI, siglas en inglés de *Clinical Laboratory Standard Institute*) publica las normas actualmente aceptadas para su estudio (CLSI, 2011). Como estas

son muy laboriosas y requieren del entrenamiento del personal que las realiza, paralelamente se impulsó el desarrollo de sistemas dirigidos al diagnóstico e identificación de las especies de micoplasmas de mayor interés clínico, que al mismo tiempo persiguen determinar su perfil de susceptibilidad antimicrobiana.

Varios sistemas diagnósticos se comercializan actualmente a nivel internacional, pero la interpretación de sus resultados debe realizarse con cautela pues algunos de ellos no se ajustan totalmente a las recomendaciones del CLSI. Por ejemplo, ninguno utiliza un método de dilución para cuantificar el inóculo a la concentración inicial que se recomienda,  $10^4$  unidades formadoras de colonias (UFC)/mL; por otra parte no permiten informar la susceptibilidad antimicrobiana para *Ureaplasma* spp. y *Mycoplasma hominis* por separado, lo que ante cultivos positivos a las dos especies imposibilita determinar la susceptibilidad específica y conduce a reportes incorrectos de resistencia (Beeton ML y Spiller OB, 2016).

La limitación más importante de estos sistemas de diagnóstico es el uso de concentraciones de antimicrobianos diferentes a las recomendadas por las normas del CLSI, lo que no permite informar resultados que se correlacionen con los puntos de corte establecidos por dichas normas. Esto explica la gran variedad en las proporciones de aislados resistentes informadas en las diferentes regiones del mundo e incluso dentro de un mismo país (Ye G *et al.*, 2014; Huang C *et al.*, 2016). Aunque hasta hoy los sistemas diagnósticos comercialmente disponibles constituyen métodos más sencillos se reconocen solo útiles para la pesquisa inicial, pero no se acepta su empleo para la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos recomendados para el tratamiento. Esta deberá estudiarse siguiendo la metodología recomendada por el CLSI y confirmarse a través de la detección de los mecanismos moleculares de resistencia (Beeton ML y Spiller OB, 2016).



En Cuba, en el año 2016, se introdujo en los laboratorios de Microbiología de la red nacional de salud pública el sistema MYCO WELL D-ONE (CPM Scientifica, Italia) para el diagnóstico de las infecciones por *Ureaplasma* spp. y *Mycoplasma hominis*; no obstante desde el 2007 ya se utilizaban en algunos laboratorios otros sistemas diagnósticos con el mismo propósito (Díaz L *et al.*, 2013). El MYCO WELL D-ONE utiliza los puntos de corte establecidos por el CLSI para la interpretación de los resultados de la susceptibilidad antimicrobiana, y tiene como ventaja que si se garantiza la concentración adecuada del inóculo, determinada a través de los métodos convencionales, los resultados obtenidos son confiables. Datos no publicados de estudios realizados en el país utilizando este sistema, así como un estudio realizado por Ramírez Y y colaboradores en 2018, sugieren una tasa alta de resistencia a los antimicrobianos de elección para el tratamiento de infecciones por *Ureaplasma* spp., pero estas evidencias deberán confirmarse a través de los métodos convencionales y moleculares (Mesa I *et al.*, 2017; Marrero C *et al.*, 2017; Ortiz C *et al.*, 2017; Villa, Y *et al.*, 2017, López M *et al.*, 2017; Ramírez Y *et al.*, 2018).

Por otra parte, *M. pneumoniae* constituye una causa frecuente de infecciones del tracto respiratorio alto y bajo en humanos, resultando en enfermedades que varían desde formas leves de traqueobronquitis hasta casos severos de neumonía intersticial (Waites KB *et al.*, 2017). Otras infecciones respiratorias causadas por esta bacteria, como la faringitis y el síndrome coqueluchoide, son también eventos infecciosos de gran incidencia a nivel internacional entre la población infante-juvenil (Jacobs E *et al.*, 2015; Wen X *et al.*, 2018). Especialmente en fases epidémicas, que se suceden cada 3-7 años, hasta el 40 % de los casos de neumonía adquirida en la comunidad son atribuidos a *M. pneumoniae*, principalmente entre niños (Jiang Z *et al.*, 2021). Se sugiere que la infección por *M. pneumoniae* contribuye

al desarrollo de enfermedades respiratorias crónicas, como tos persistente y asma bronquial no controlada (Kassisse E *et al.*, 2018; Kumar, S *et al.*, 2019). También, aunque con menor frecuencia, se describen infecciones extrapulmonares que comprenden el sistema nervioso central, entre las que se incluyen encefalitis, meningitis, neuritis óptica y síndrome de Guillian-Barré; así como condiciones dermatológicas tales como eritematosis maculopapular (Narita M *et al.*, 2016). Los ensayos de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-PCR, siglas en inglés de *Real time polymerase chain reaction*) son la alternativa más sensible y específica para la detección de *M. pneumoniae* a partir de muestras respiratorias (Waites KB *et al.*, 2017).

Al igual que para *Ureaplasma* spp., las tetraciclinas, fluoroquinolonas y macrólidos son los antimicrobianos efectivos para el tratamiento de *M. pneumoniae*. Los macrólidos son el tratamiento de elección, principalmente en niños en los que el uso de las tetraciclinas y fluoroquinolonas pueden producir efectos adversos. Los aislados clínicos de *M. pneumoniae* resistentes a macrólidos se informan por primera vez en la década de 1990 y desde entonces aumenta dramáticamente su incidencia de forma variable en diferentes regiones geográficas; por ejemplo, en Japón y China se notifica resistencia a macrólidos hasta en un 90 % de los aislados, mientras que son bajos los porcentajes de resistencia que de forma general se informan en países europeos (Kogoj R *et al.*, 2018; Gullsby R *et al.*, 2019). Esta obedece principalmente a mutaciones puntuales en la subunidad 23S del gen del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr 23S) y se asocia con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) altas para eritromicina y azitromicina. En contraste, la resistencia a quinolonas y tetraciclinas en aislados clínicos de *M. pneumoniae* no se ha descrito hasta el presente (Pereyre S *et al.*, 2016; Zhao F *et al.*, 2019).

La genotipificación de *M. pneumoniae* es necesaria para la descripción de epidemias así como para entender la transmisión de la infección. La técnica basada en el análisis de variaciones en múltiples locus (MLVA, siglas en inglés de *Multiple-locus variable analysis*) tiene gran poder discriminatorio con este objetivo, y en la actualidad su uso se incrementa a nivel internacional para la caracterización de aislados y a partir de muestras clínicas (Chalker VJ *et al.*, 2015).

En Cuba, el diagnóstico de infecciones por *M. pneumoniae* solo se realiza en el Laboratorio Nacional de Referencia de Micoplasmas (LNR-M) del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK), a través de un algoritmo basado en técnicas moleculares. Estudios realizados sugieren la asociación de *M. pneumoniae* con las infecciones respiratorias en niños y adolescentes con diagnóstico de síndrome coqueluchoide, neumonía intersticial y asma no controlada (Dotres C *et al.*, 2017). De igual forma se demuestra como agente etiológico de infección respiratoria aguda (IRA) y Enfermedad Tipo Influenza en adultos (Sardiñas R, 2020). En los niños con alguna de las formas clínicas anteriores, aunque se constata una buena respuesta al tratamiento con azitromicina, se impone estudiar la susceptibilidad a los macrólidos, así como la identificación de los genotipos.

En resumen, el empleo del sistema MYCO WELL D-ONE para el diagnóstico de *Ureaplasma spp.*, único disponible en los laboratorios de Microbiología de la red nacional de salud en Cuba, podría estar conduciendo a sobreestimar la resistencia a los antimicrobianos recomendados para el tratamiento de las infecciones del tracto genitourinario debidas a estas especies. En cambio, la no disponibilidad de pruebas para el diagnóstico de *M. pneumoniae* y su centralización únicamente en el LNR-M en el IPK, impide estimar su papel como agente etiológico de infecciones del tracto respiratorio, así como vigilar sistemáticamente la susceptibilidad de esta especie a los antimicrobianos y sus genotipos.

En atención a todo lo anteriormente comentado se plantean las siguientes preguntas de investigación, la hipótesis predictiva y los objetivos del presente trabajo de tesis:

- ¿Cuál es la magnitud en Cuba de la resistencia a los antimicrobianos de elección para el tratamiento de las infecciones por *Ureaplasma* spp. y *Mycoplasma pneumoniae*?
- ¿Qué mecanismos moleculares están implicados?
- ¿Se relacionan los genotipos de *Mycoplasma pneumoniae* que circulan en Cuba con la resistencia a macrólidos?

### **1.1. Hipótesis**

La resistencia a los antimicrobianos recomendados para el tratamiento de las infecciones por *Ureaplasma* spp. constituye un problema sobreestimado en Cuba; mientras que las infecciones respiratorias por *Mycoplasma pneumoniae* resistente a macrólidos representan un fenómeno subvalorado y relacionado a genotipos específicos.

### **1.2. Objetivos**

#### **Objetivo general**

Caracterizar la resistencia a los antimicrobianos de elección para el tratamiento de las infecciones por *Ureaplasma* spp. y *Mycoplasma pneumoniae*, Cuba (2012 – 2018).

#### **Objetivos específicos**

1. Describir la frecuencia de resistencia a los macrólidos, fluoroquinolonas y tetraciclinas recomendados para el tratamiento de las infecciones por *Ureaplasma* spp. y *Mycoplasma pneumoniae*.
2. Demostrar en los aislados de *Ureaplasma* spp. la presencia del gen *tet(M)* como el mecanismo molecular responsable de la resistencia a tetraciclina.

3. Determinar los mecanismos moleculares más frecuentemente asociados a la resistencia a macrólidos en *Ureaplasma* spp. y *Mycoplasma pneumoniae*.
4. Relacionar los genotipos de *Mycoplasma pneumoniae* con la resistencia a macrólidos.

### **1.3. Novedad científica y valor práctico y teórico de la tesis**

#### **Novedad científica**

- Se presentan las primeras evidencias de la resistencia a macrólidos y tetraciclinas en aislados cubanos de *Ureaplasma* spp. y *Mycoplasma pneumoniae* obtenidas empleando el método de referencia, y la confirmación de estas a través de la demostración de los determinantes genéticos más frecuentemente asociados.
- Se muestran por primera vez resultados de la diversidad de genotipos de *Mycoplasma pneumoniae* en Cuba y se informan secuencias tipo no descritas anteriormente a nivel internacional. Esto aporta elementos para la construcción de una línea base útil para estudios venideros de epidemiología molecular.

#### **Valor teórico**

Este documento de tesis constituye un material de consulta obligado para la realización de nuevas investigaciones encaminadas a confirmar los resultados generados por este estudio descriptivo. En él se incluye la información relacionada con el primer estudio integral de la resistencia antimicrobiana en *Ureaplasma* spp. y *Mycoplasma pneumoniae* en Cuba en relación con:

- La aplicación de la metodología de referencia para la determinación de los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de *Ureaplasma* spp. y *Mycoplasma pneumoniae*.

- Los primeros estudios moleculares para la detección de los determinantes genéticos de resistencia en *Ureaplasma* spp. y *Mycoplasma pneumoniae*.
- Las primeras evidencias de la diversidad de genotipos de *Mycoplasma pneumoniae* en Cuba.

### **Valor práctico**

- Queda estandarizada en el LNR-M del IPK la metodología de referencia recomendada para la determinación de los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de aislados de *Ureaplasma* spp. y *Mycoplasma pneumoniae* y la detección de los determinantes genéticos de resistencia, actualmente al servicio de la vigilancia para toda la red de laboratorios de Microbiología a nivel nacional.
- Los estudios de la susceptibilidad a los antimicrobianos de aislados de *Ureaplasma* spp. utilizando el sistema MYCO WELL D-ONE permiten desaconsejar su uso para el informe de la resistencia a los antimicrobianos.
- Se aportan evidencias de la efectividad de las fluoroquinolonas para el tratamiento de las infecciones por micoplasmas y ureaplasmas en Cuba. En cambio, para *Mycoplasma pneumoniae* la resistencia a macrólidos se advierte como un problema con implicaciones potenciales sobre el tratamiento.
- A partir de esta investigación, realizada sobre la base de datos secundarios generados por una vigilancia pasiva, se demuestra la importancia de implementar la vigilancia sistemática de las infecciones respiratorias por *Mycoplasma pneumoniae*.

## **II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Generalidades.

El término micoplasmas se utiliza para hacer referencia a las bacterias de la clase *Mollicutes* que son aquellas que se distinguen por la carencia de pared celular; deriva del latín *mollis*, que significa suave o flexible, y *cutis*, que significa piel. Esto les confiere gran plasticidad y una morfología diversa, que varía desde formas cocáceas hasta de estrellas o filamentos, lo que unido a sus reducidas dimensiones les permite atravesar filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  (Machado AA *et al.*, 2001; Razin S y Hayflick *et al.*, 2010). La ausencia de pared celular condiciona además alta sensibilidad al choque osmótico, a los cambios de temperatura, rayos ultravioletas y detergentes; así como la resistencia a la acción de antimicrobianos como los  $\beta$ -lactámicos (Windsor H, 2010; Meseguer MA *et al.*, 2012).

Las bacterias de la clase *Mollicutes* se tiñen como gramnegativas y muestran diferentes formas en dependencia de la especie, de los constituyentes del medio de cultivo y de la fase de crecimiento. Su estructura celular es simple y poseen un genoma circular de ácido desoxirribonucleico (ADN) de cadena doble de muy pequeño tamaño; solo alcanza la quinta parte o la mitad del tamaño del ADN de otras bacterias (Rivera JA *et al.*, 2003; Rivera JA, 2006; Díaz FJ y Flores S, 2012). Este escaso volumen del material genómico limita sus capacidades biosintéticas y por eso presentan requerimientos nutritivos exigentes para su cultivo *in vitro* (Garrity WM y Seartes DB, 2001; Cervantes EG, 2009). Al respecto se piensa que derivaron de bacterias más complejas que durante la evolución perdieron gran parte del material genético; por ejemplo, los genes que codificaban la síntesis de la pared celular o proteínas implicadas en el ciclo del ácido cítrico (McAuliffe L *et al.*, 2006).

La estructura celular de los micoplasmas se asemeja a la de las células superiores. La membrana presenta proteínas en mayor proporción y es menos rica en fosfolípidos,



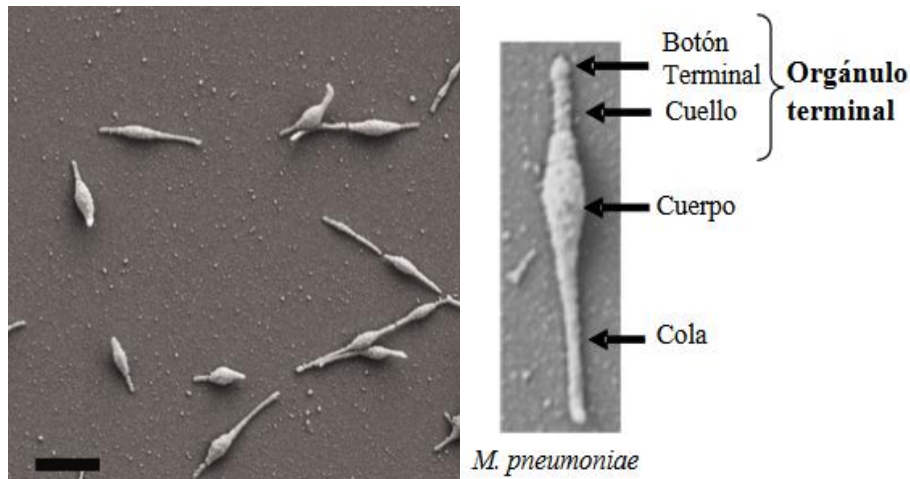
glicolípidos y esteroides, por lo que dependen de ácidos grasos y colesterol exógenos. Sus escasas vías metabólicas se dedican principalmente a la generación de energía y en menor grado a proporcionar sustratos para las vías sintéticas. Inteligentemente, compensan esto con la capacidad de sus enzimas para interactuar con múltiples sustratos. Usan el codón UGA para codificar triptófano (Waites KB *et al.*, 2001).

Los micoplasmas se aíslan de hospedadores humanos, animales y plantas. Como desarrollan adaptaciones que les permiten tomar de ellos los precursores de los que carecen, se les considera como modelos para el estudio de las funciones esenciales de las células vivas (Rottem S, 2003; Waites KB *et al.*, 2005; Solís R, 2006).

Dentro de la clase *Mollicutes* los géneros de importancia clínica son *Mycoplasma* y *Ureaplasma*. En el género *Mycoplasma* se describe en humanos a *M. pneumoniae* junto con otras 15 especies. Por otra parte, *U. urealyticum* y *U. parvum* constituyen las especies de interés para la salud humana dentro del género *Ureaplasma* (Garrity GM *et al.*, 2007; Góngora *et al.*, 2015).

## **2.2. *M. pneumoniae*.**

*M. pneumoniae* no se encuentra libremente en la naturaleza y se le considera un patógeno del tracto respiratorio, que parasita la superficie epitelial del hospedador (Parrott GL, 2016). Las células son de pequeño tamaño (1 - 2  $\mu\text{m}$  de largo y 0,1 - 0,2  $\mu\text{m}$  de ancho) y pleomórficas, generalmente con un aspecto en forma de matraz, pues presentan una estructura terminal a la que se denomina orgánulo de adhesión celular (figura 2.1). Sus colonias raramente exceden los 100  $\mu\text{m}$  de diámetro y su genoma consiste en solo 816,394 pares de bases y 687 genes (Waites KB y Talkington DF, 2004).



**Figura 2.1. Imágen de células de *M. pneumoniae* obtenida a través de microscopía electrónica de barrido.** Fuente: Waites KB *et al.*, 2008.

La extensión puntiaguda u orgánulo de adhesión a las células hospedadoras se involucra en el movimiento a lo largo de las superficies sólidas, en la división celular y en su capacidad de adsorber glóbulos rojos de diferentes especies animales. Los estudios de la ultraestructura de *M. pneumoniae* mediante microscopía electrónica de transmisión revelan la presencia de un núcleo denso de electrones en el centro de este orgánulo (Waites KB *et al.*, 2008).

### **2.2.1. Patogénesis de *M. pneumoniae*.**

*M. pneumoniae* no se asocia con infecciones fulminantes, tiende a colonizar y a producir infecciones respiratorias de curso crónico (Su HC *et al.*, 2007). Se adhiere al epitelio ciliado bronquial del hospedero como requisito previo para la colonización y la infección, etapa mediada por la adhesina P1, que constituye su principal factor de virulencia. Esta es una proteína transmembrana que se encuentra en la punta del orgánulo de adhesión y que favorece la adherencia al epitelio respiratorio así como su movilidad por deslizamiento. La segunda adhesina más importante es la P30; esta se encuentra en forma de aglomerados en la punta del orgánulo de adhesión, también se involucra en la movilidad por deslizamiento y coordina la división celular. Otras proteínas accesorias de la adhesión al epitelio

respiratorio son las proteínas de alto peso molecular HMW-1, HMW-2 y HMW-3, y otras como las proteínas A, B, C, P65 y P116 (Chaudhry R *et al.*, 2016).

El descubrimiento de la toxina del “Síndrome de distrés respiratorio adquirido en la comunidad” (CARDS, siglas en inglés de *Community-Acquired Respiratory Distress Syndrome*), molécula específica de micoplasmas, desplazó el dogma sobre la no producción de exotoxinas por estos microorganismos. Es una toxina vacuolizante y ribosilante de difosfato de adenosina con alta afinidad por la proteína surfactante A y la anexina A2 en las células del epitelio respiratorio, que se internaliza produciendo ciliostasis, fragmentación nuclear, citosinas proinflamatorias y en consecuencia una reacción inflamatoria celular aguda (Parrott GL *et al.*, 2017).

Otro factor de patogenicidad lo constituye la secreción de peróxido de hidrógeno y el anión superóxido, que en conjunto con la molécula endógena de oxígeno tóxico generada por la célula hospedera, inducen estrés oxidativo en el epitelio respiratorio. Los efectos son la pérdida y reducción de glutatiónina, la desnaturalización de la hemoglobina, lisis celular y la reducción de la degradación enzimática de los peróxidos endógenos por inhibición de la catalasa (Diaz MH y Winchell JM, 2016).

*M. pneumoniae* estimula los linfocitos B y T e induce la formación de anticuerpos específicos y auto-anticuerpos que reaccionan con una variedad de tejidos del huésped y el antígeno I de los eritrocitos, responsable de la producción de las crioaglutininas. Este efecto sobre el hospedador causa fenómenos autoinmunes y da lugar a parte de los síntomas de la infección aguda y las complicaciones extrapulmonares (Acosta B *et al.*, 2011; Atkinson TP y Waites KB, 2014; Muñoz ME, 2014). Por otro lado, se reconocen más de 30 lipoproteínas de *M. pneumoniae* con potentes propiedades inflamatorias, como son la NALP1/NALP2 y la F0F1-ATPasa, las que ocasionan movilización y reclutamiento

de linfocitos y neutrófilos a nivel pulmonar y consecuentemente inflamación (Saraya T *et al.*, 2016).

### **2.2.2. Epidemiología de las infecciones por *M. pneumoniae*.**

*M. pneumoniae* se transmite por microgotas de aerosol de las secreciones respiratorias esparcidas por la tos, por lo que se necesita del contacto persona a persona. La infección se disemina más fácilmente en el marco intrafamiliar, en guarderías, escuelas e internados. Hasta en el 40 % de las personas infectadas por *M. pneumoniae* la infección puede cursar de forma asintomática. El período de incubación se estima entre una y tres semanas. Los brotes son frecuentes durante las epidemias, que ocurren cada tres a siete años (Waites KB *et al.*, 2017; Jiang Z *et al.*, 2021).

*M. pneumoniae* puede inducir infecciones del tracto respiratorio superior e inferior, en todas las regiones del mundo y tanto de forma endémica como epidémica (Beeton ML *et al.*, 2020). Aunque la traqueobronquitis es la manifestación clínica más común, la neumonía es la más importante. Se le considera responsable del 4 al 8 % de las neumonías bacterianas adquiridas en la comunidad (NBAC) durante los períodos de endemicidad; sin embargo, puede causar entre un 20 y 40 % de las que se producen en la población general durante epidemias, y hasta de un 70 % en las poblaciones cerradas (Jacobs E *et al.*, 2015; Jiang, Z *et al.*, 2021). Esta proporción varía de acuerdo a la edad, pues los escolares y los adolescentes son los grupos más afectados, aunque la bacteria puede causar infecciones en todas las edades. Se describe además como patógeno en otras infecciones del tracto respiratorio superior, tales como: faringitis, bronquitis, laringotraqueítis, rinosinusitis, otitis media, miringitis y bronquiolititis (Dorigo-Zetsma JW *et al.*, 2001; Miyashita N *et al.*, 2008; Gadsby NJ *et al.*, 2012; Winchell JM, 2013).

También, aunque con menos frecuencia se asocia a una gran variedad de infecciones extrapulmonares. Las más comunes son las manifestaciones dermatológicas, incluyendo la

urticaria y el eritema multiforme. Las más severas son las infecciones del sistema nervioso central que afectan cerebro, meninges, cordón espinal y nervios periféricos (Narita M, 2009). Por otra parte, se documenta el papel de *M. pneumoniae* en pericarditis, miocarditis y endocarditis, cuyos efectos van desde leves o condiciones asintomáticas hasta una enfermedad fatal (Pillai SC *et al.*, 2015; Al-Zaidy SA *et al.*, 2015; Kammer J *et al.*, 2016; Meyer S *et al.*, 2016).

### **2.3. *Ureaplasma spp.***

*U. parvum* y *U. urealyticum* se clasifican en 14 serovares diferentes de acuerdo a sus características genotípicas: *U. urealyticum* con diez serovares (2, 4, 5, 7 al 13) y *U. parvum* con cuatro serovares (1, 3, 6 y 14) (Kong FZ *et al.*, 2000a; Payne MS *et al.*, 2014; Urszula K *et al.*, 2014).

Estas especies se distinguen por requerir la hidrólisis de la urea como única fuente de carbono y energía, liberando como producto final gran cantidad de amonio, lo que provoca un aumento rápido en el pH del medio. El ATP lo generan justamente a través del gradiente electroquímico producido por la liberación de amonio durante la hidrólisis intracelular de la urea (Combaz-Söhnchen N y Kuhn A, 2017). Necesitan además de una atmósfera de 5 - 10 % de dióxido de carbono para su desarrollo en medios con agar (Pérez MF y Almanza C, 2001; Meseguer MA *et al.*, 2012).

El genoma de los ureaplasmas consiste en una molécula circular de ADN bicatenario de alrededor de 500 megabases y bajo contenido de guanina y citosina (Chanock RM y Tully JG, 1990; Taylor-Robinson D, 2002). La especie *U. urealyticum* tiene un tamaño de 947 kpb y contiene 711 genes, mientras *U. parvum* es menor, con un tamaño de 750 kpb y 594 genes (Waites KB *et al.*, 2012).

Las especies de este género se conocen como “cepas T”, del término en inglés "tiny" (pequeño), debido al diminuto tamaño de sus colonias en medio sólido, lo que exige de un

alto poder de resolución del microscopio óptico (0,01-0,5 mm) para poder observarlas. Sus células tienen forma esférica o cocobacilar, con diámetros entre 0,2 - 0,3  $\mu\text{m}$  (Foulon W *et al.*, 1995; Waites KB y Taylor-Robinson D, 2007).

### **2.3.1. Patogénesis de *Ureaplasma* spp.**

El mecanismo de adherencia de los ureaplasmas constituye un prerrequisito para su supervivencia y patogenicidad. Sus estructuras para la adherencia a las células hospedadoras son un complejo de proteínas interactivas, adhesina y proteínas accesorias (Ifeanyi OE, 2018). Se plantea ocurre una fusión de la membrana de los ureaplasmas con la membrana de una variedad de células del hospedador humano, en las que se incluyen los eritrocitos, los espermatozoides y las células epiteliales uretrales (Kokkayil P y Dhawan B, 2015).

El factor de virulencia esencial de *Ureaplasma* lo constituye el antígeno de múltiples bandas (MBA, siglas en inglés de *Multiple banded antigen*), lipoproteína expuesta en la superficie celular y que se emplea para la diferenciación entre *U. urealyticum* y *U. parvum* (Shimizu T *et al.*, 2008). Este antígeno es inmunogénico, muy variable *in vitro* y puede involucrarse en la respuesta inflamatoria del hospedero (Kong FZ *et al.*, 2000b; Robinson JW *et al.*, 2013).

Por otra parte se conoce que las fosfolipasas A1, A2 y C actúan hidrolizando los fosfolípidos celulares de la placenta, liberan gran cantidad de ácido araquidónico y alteran indirectamente la síntesis de prostaglandinas, lo que desencadena señales bioquímicas que inician las contracciones del útero en embarazadas y por ende el comienzo de la labor de parto (Goldenberg RL *et al.*, 2008; Hunjak B *et al.*, 2014).

En este género también se demuestra la actividad de la proteasa sobre la IgA de las mucosas, lo que facilita la colonización (Waites KB *et al.*, 2005). Asimismo, la actividad ureasa de *Ureaplasma* spp. causa toxicidad en los tejidos del hospedador debido al cambio en el pH como consecuencia de la generación de amonio (Robinson JW *et al.*, 2013).

La virulencia de las especies de *Ureaplasma* también se determina por la habilidad de formar biopelículas, las que contribuyen a su persistencia y a la producción de inflamación crónica (Pandelidis K *et al.*, 2013). Sin embargo, son escasas las evidencias que demuestren su impacto en la variación de la CMI de los antimicrobianos que se utilizan en el tratamiento (Feng CH *et al.*, 2015).

Varios estudios indican que la interacción de los ureaplasmas con los macrófagos y monocitos inducen la expresión y secreción de citoquinas proinflamatorias, principalmente el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y la interleuquinas 6 (Meseguer MA *et al.*, 2012).

### **2.3.2. Epidemiología de las infecciones por *Ureaplasma* spp.**

Los miembros del género *Ureaplasma* se consideran parte de la microbiota genital normal, con una tasa de colonización que varía entre 40 y 80 %. No obstante, se les asocia a infecciones urogenitales en hombres y mujeres, así como a infecciones respiratorias en neonatos. Se les entiende como patógenos oportunistas porque pueden aislarse tanto del tracto urogenital bajo de humanos saludables y enfermos (Waites KB *et al.*, 2012). Pueden transmitirse por diferentes vías, la sexual a través del contacto desprotegido (vaginal, oral o anal), vertical a través del canal de parto y por trasplante de órganos (Koletar VL, 2013). Los ureaplasmas son los microorganismos más frecuentes transmitidos de la madre al feto durante el embarazo o el parto. La colonización del tracto respiratorio de algunos recién nacidos o prematuros se asocia con la neumonía, hipertensión pulmonar persistente, infección crónica del sistema nervioso central y displasia broncopulmonar (Viscardi RM, 2014; Brand MC *et al.*, 2018).

Varios estudios indican a *U. urealyticum* como causa de uretritis no gonocócica (UNG) en hombres, aunque su patogenicidad todavía no está bien definida. En cambio, se piensa que *U. parvum* es un organismo comensal en la uretra del hombre (Deguchi T *et al.*, 2004; Wetmore CM *et al.*, 2011; Zhang N *et al.*, 2014). En las mujeres *Ureaplasma* spp. se

asocia a cervicitis, vaginosis bacteriana, salpingitis, enfermedad pélvica inflamatoria, absceso tubo-ovárico, fiebre postparto y postaborto, endometritis puerperal, abortos repetidos e infertilidad (Larsen B y Hwang J, 2010; Taylor-Robinson D, 2017; Bartkeviciene D *et al.*, 2020).

La comparación de las tasas de positividad de *U. urealyticum* a partir del estudio de muestras de hombres infértiles y de individuos controles demuestra una asociación significativa con la infertilidad masculina; sin embargo, para *U. parvum* esto no se confirma aún (Huang C *et al.*, 2015). Varios factores se relacionan con dicha asociación, entre ellos la adherencia de la bacteria a las células espermáticas lo que causa disminución de su movilidad, la producción de neuraminidasa lo que impide la anidación del blastocito, así como un efecto deletéreo directo sobre la cromatina nuclear y el ADN de la esperma (Al-Sweih NA *et al.*, 2012; Lee JS *et al.*, 2013).

Las especies de *Ureaplasma* también pueden producir infecciones oportunistas en pacientes inmunocomprometidos con condiciones como la enfermedad de Hodgkin, lupus eritematoso, trasplante renal y enfermedad cardíaca (Waites KB *et al.*, 2009).

#### **2.4. Métodos para el diagnóstico microbiológico de las infecciones por micoplasmas y ureaplasmas.**

La detección e identificación de micoplasmas y ureaplasmas puede abordarse a través de técnicas convencionales como el cultivo bacteriológico, las pruebas bioquímicas, enzimáticas y serológicas, y por medio de herramientas de Biología Molecular, como la hibridación de ácidos nucleicos (HAN) y la PCR; para cada una de ellas se reconocen ventajas y desventajas (Waites KB *et al.*, 2012). Actualmente también se aprecia una tendencia al desarrollo y uso de métodos de avanzada con base en el microcultivo, lo que permite la disponibilidad a nivel comercial de varios estuches o sistemas para el diagnóstico (Kokkayil P y Dhawan B, 2015).



### **2.4.1. Diagnóstico convencional.**

#### **2.4.1a. Cultivo bacteriológico.**

El diagnóstico microbiológico basado en el cultivo constituye la prueba de oro para la identificación de micoplasmas y ureaplasmas. Este método es esencial para la obtención de aislados clínicos y su posterior caracterización biológica y molecular, así como para los estudios de resistencia antimicrobiana. Sin embargo, es laborioso y demorado pues estos microorganismos son exigentes en sus requerimientos para el cultivo *in vitro* y necesitan de medios de cultivo complejos, los que deben contener como principio: peptonas, ácidos nucleicos preformados (administrados en el extracto de levadura) y suero fresco de animal, el cual provee el colesterol. También es preciso incorporar antifúngicos y antibacterianos a los medios de cultivo, así como un indicador de pH que permita revelar el crecimiento pues no causan turbidez como evidencia de crecimiento microbiano (Brooks GF *et al.*, 2007).

Para el aislamiento de las especies de *Ureaplasma* los medios de cultivo requieren de la adición de urea y de un pH entre 6 y 6,2. Estas son de crecimiento rápido, entre 18 y 24 horas, y en la superficie de los medios sólidos forman colonias de pequeño tamaño (15 - 30  $\mu\text{m}$ ), de color carmelita con un centro oscuro opaco y con muy poco crecimiento periférico, semejantes a “erizos de mar” (Tully JC, 1995; Juhász E *et al.*, 2011).

Contrariamente, el crecimiento de *M. pneumoniae* es lento pues puede demorar de tres a seis semanas. Los medios de cultivo específicos para esta especie requieren de la adición de glucosa y de un pH entre 7 y 7,2. Al igual que los ureaplasmas no provoca turbidez en medio líquido y en medio sólido produce colonias pequeñas con una apariencia granular y en forma de “huevo frito” (Loens K *et al.*, 2010).

Actualmente hay disponibilidad de sistemas de microcultivo que se consideran de avanzada para el diagnóstico. Los más generalizados, por su uso, son los sistemas para la

detección e identificación de *Ureaplasma* spp. y *M. hominis*. Estos constituyen pruebas más rápidas y una alternativa de diagnóstico útil en sitios donde los métodos de aislamiento de estas bacterias no están disponibles o son de pobre acceso (Kokkayil P y Dhawan B, 2015).

La mayoría de ellos permiten una identificación y cuantificación rápida de *Ureaplasma* spp. y *M. hominis* entre 24 y 48 h, que se fundamentan en la habilidad de estas bacterias de metabolizar la urea y la arginina, respectivamente. Estos sistemas consisten en placas con micropocillos que contienen medios de cultivo deshidratados con diferentes sustratos, e incluyen además un tubo con un medio simple con antimicrobianos para el transporte y preservación de las muestras a analizar para el diagnóstico de micoplasmas urogenitales (Machado L *et al.*, 2014). Ejemplos de ellos son: *Mycoplasma* IST2, Mycofast Revolution, MYCO WELL D-ONE, SIR *Mycoplasma* (Redelinghuys MJ *et al.*, 2013; D'Inzeo T *et al.*, 2017; Morris D *et al.*, 2020).

En cambio, para *M. pneumoniae* el único sistema disponible para el que se han realizado estudios de validación en Cuba es el ARI WELL D-ONE (CPM Scientifica, Italia). Este permite el diagnóstico presuntivo de diferentes especies bacterianas que producen infecciones respiratorias agudas, e incluye un sector específico para la detección de micoplasmas. Como en los casos anteriores consiste en una placa con pocillos que contienen medios de cultivo deshidratados con diferentes sustratos e incluye también un tubo con un medio simple con antimicrobianos para el transporte y preservación de las muestras clínicas. La galería de pocillos dirigida a la detección de los micoplasmas permite la identificación de *M. pneumoniae*, *M. hominis* y otros micoplasmas fermentadores de glucosa en función del perfil de cambios de color en estos. Los resultados de la evaluación de este sistema apuntan a que tiene una alta especificidad y sensibilidad (Mondeja B *et al.*, 2016).

Estos sistemas, además de ser más rápidos y fáciles de usar e interpretar que los métodos de cultivo convencionales, no requieren de personal especializado y los resultados son fáciles de interpretar (Redelinghuys MJ *et al.*, 2013).

#### **2.4.1b. Pruebas bioquímicas.**

Para la identificación y clasificación de las bacterias de la clase *Mollicutes* se reconoce la utilidad de la demostración de entre 150 a 175 actividades enzimáticas. La potencialidad de obtener energía involucrando la producción de metabolitos detectables *in vitro* en presencia de los indicadores correctos (generalmente rojo fenol) permite su identificación (Pollack JD, 1996).

Por ejemplo, la hidrólisis de urea, arginina y lípidos, la fermentación de la glucosa, la reducción del tetrazolium y otras características como la capacidad de hemo-adsorción y la lisis de eritrocitos de carnero, permiten la obtención de un perfil bioquímico único de cada género y especie, por medio del cual se logra la identificación de la mayoría de los que se consideran de interés clínico (Razin S, 1983).

La actividad de la enzima ureasa es, por ejemplo, la característica más importante que permite discriminar a los ureaplasmas de otros organismos de la clase *Mollicutes* (Combaz-Söhnchen N y Kuhn A, 2017). En cambio, la capacidad de reducir el tetrazolium permite la diferenciación de las colonias de *M. pneumoniae* de las de otras especies de origen humano y la obtención de resultados en unas pocas horas. Las colonias con capacidad para reducirlo se tornan rosadas inicialmente y rojas oscuras con el paso del tiempo (Simmons WL y Dybvig K. 2015.).

También tiene utilidad en la identificación de *M. pneumoniae* la capacidad de utilización de la glucosa como fuente de carbono y energía. Los ensayos de fermentación de esta se basan en la producción de ácido láctico como metabolito final del proceso y por

consiguiente en una disminución de pH del medio de cultivo, lo que origina cambios de su color (Razin S y Cirilo VP, 1983).

#### **2.4.1c. Métodos serológicos.**

Los métodos para el diagnóstico serológico de *Ureaplasma* spp. incluyen la microimmunofluorescencia, la inhibición del metabolismo y los ensayos inmunoenzimáticos, pero dada la ubicuidad de la bacteria en individuos sanos se dificulta la interpretación de sus resultados. Por ello no se recomiendan para el diagnóstico de micoplasmas genitales (Waites KB *et al.*, 2005).

De la misma forma, la especificidad y sensibilidad de los métodos serológicos para el diagnóstico de las infecciones producidas por *M. pneumoniae* se cuestiona pues se demuestran reacciones cruzadas con otras especies de micoplasmas, así como variabilidad en los niveles de anticuerpos (Venuta ME *et al.*, 2016). La sensibilidad analítica del diagnóstico serológico de las infecciones agudas por *M. pneumoniae* depende del momento de la toma de la muestra así como las características del método empleado. Los resultados más certeros se obtienen cuando se colectan sueros pareados al menos con dos semanas de diferencia entre la primera y segunda muestra, y cuando estos se analizan simultáneamente tanto para demostrar IgM como IgG, buscando documentar aumento de cuatro veces o más en el título de anticuerpos. Esto hace que la serología sea útil fundamentalmente para estudios epidemiológicos (Waites KB y Talkington DF, 2004).

#### **2.4.2. Diagnóstico molecular.**

Varios métodos de PCR convencional se utilizan para el diagnóstico e identificación de las especies de *Ureaplasma*, los que tienen como blanco la subunidad 16S del gen del ARNr (ARNr 16S), la región espaciadora intergénica ARNr 16S-ARNr 23S, el gen de la ureasa y del MBA. Los ensayos de RT-PCR utilizan fundamentalmente como blanco estos dos últimos (Dhawan B *et al.*, 2006; Larsen B y Hwang J, 2010; Dhawan B *et al.*, 2012).

La primera descripción del empleo de métodos moleculares para la detección directa de *M. pneumoniae* se publicó a finales de los años 1980 y desde entonces se convierten en el método de diagnóstico de elección. Aunque el cultivo bacteriológico se consideró por mucho tiempo como la técnica de oro, la elevada sensibilidad analítica y el significativo menor tiempo de demora de los métodos moleculares condujeron a reconsiderar este criterio, pero muchos de estos no han sido aún validados extensamente contra el cultivo (Loens K y Ieven M, 2016). El primer PCR descrito utilizó como blanco el gen de la proteína de adhesión P1; posteriormente se describieron otros blancos genéticos como el ARNr 16S, el operón de la ATPasa, los genes *tuf*, *parE*, *dnaK*, *pdhA*, *repMp1* y el gen de la toxina CARDS (Zhou Z *et al.*, 2015, Waites KB *et al.*, 2012).

El PCR convencional para *M. pneumoniae* también ha sido reemplazado por el RT-PCR debido a las ventajas de este último, entre las que sobresalen la obtención del resultado en un menor tiempo, varios formatos para la detección, menor probabilidad de contaminación, mayor sensibilidad y especificidad, la posibilidad de proveer datos cuantitativos, detectar genes de resistencia y de analizar relaciones genéticas entre aislados. La especificidad mejorada del RT-PCR se debe fundamentalmente al uso de un tercer oligonucleótido (sonda) que se une con la secuencia diana, lo que minimiza la reactividad cruzada y la detección de amplificaciones indeseadas (Ieven MM y Loens K. 2013; Diaz MH y Winchell JM, 2016).

Las ventajas de los métodos moleculares sobre la serología y el cultivo radican en su mayor sensibilidad y en la rapidez del procesamiento y obtención del resultado, a partir de una sola muestra, en la cual la bacteria puede no estar viable; además permiten su detección en etapas tempranas del curso de la infección (Waites KB *et al.*, 2017).

Más recientemente las técnicas de secuenciación completa del genoma, tanto de *M. pneumoniae* como de *Ureaplasma* spp., se vislumbran como una alternativa novedosa

para el diagnóstico. Sin embargo, hasta la fecha se utilizan infrecuentemente y solo para la caracterización de aislados (Paralanov V *et al.*, 2012; Lee JK *et al.*, 2019).

### **2.5. Tratamiento antimicrobiano de las infecciones por micoplasmas y ureaplasmas.**

Entre los antimicrobianos con gran potencial terapéutico para las infecciones causadas por micoplasmas y ureaplasmas se incluyen las tetraciclinas, el grupo de los macrólidos, lincosamidas, estreptograminas y ketólidos (MLSK), así como las fluoroquinolonas. Otros como los aminoglucósidos y el cloranfenicol muestran *in vitro* actividad contra los micoplasmas, pero solo se utilizan ante la resistencia a tetraciclinas o el fracaso clínico tras el empleo de otros antimicrobianos (Waites KB, 2008; Ponyai K *et al.*, 2013, Bébéar C, 2010).

Históricamente las tetraciclinas se describen como los antibióticos más ampliamente utilizadas para el tratamiento de las infecciones urogenitales por micoplasmas y ureaplasmas y en las infecciones respiratorias causadas por *M. pneumoniae* en adultos (Bébéar CM y Kempf I, 2005). A pesar de su toxicidad potencial para los dientes y huesos también se usan con resultados satisfactorios para tratar infecciones del sistema nervioso central en neonatos ante la no disponibilidad de otras alternativas (Waites KB, 2005).

Por su parte los macrólidos constituyen los antimicrobianos de elección para el tratamiento de las infecciones respiratorias por *M. pneumoniae*, fundamentalmente en los niños, así como para el tratamiento de las infecciones en neonatos debidas a *Ureaplasma* spp. (Waites KB y Talkington D, 2004). Por otra parte, las fluoroquinolonas se erigen como la mejor opción para el tratamiento de las infecciones respiratorias y del tracto urogenital por micoplasmas, particularmente en infecciones en pacientes inmunocomprometidos (Bébéar CM *et al.*, 2008).

### **2.5.1. Resistencia de micoplasmas y ureaplasmas a los antimicrobianos de elección.**

#### **2.5.1a. Resistencia intrínseca.**

En micoplasmas se reconocen dos tipos de resistencia intrínseca. La primera es común a todas las especies de la clase *Mollicutes* pues como carecen de pared celular son resistentes a los inhibidores de la síntesis de esta, tales como los  $\beta$ -lactámicos, glicopéptidos, fosfomicina, polimixinas y sulfonamidas. La segunda es específica de algunas especies y concierne principalmente al grupo MLSK. Por ejemplo, *M. pneumoniae* y *M. genitalium* son susceptibles a los antimicrobianos del grupo MLSK excepto la lincomicina, para la que se registra una moderada actividad. Así mismo, las especies de *Ureaplasma* son susceptibles a los macrólidos, ketólidos y estreptograminas pero resistentes a las lincosamidas (Waites KB, 2014).

#### **2.5.1b. Resistencia adquirida.**

Entre los diferentes mecanismos de resistencia adquirida registrados en las bacterias los únicos descritos *in vivo* en micoplasmas son la modificación y protección del sitio de acción del antimicrobiano. Dicha resistencia está mediada tanto por mutaciones cromosomales como por adquisición de un transposón (Bébéar CM y Kempf I, 2005).

Para las tetraciclinas la resistencia en *Ureaplasma* spp. se documenta desde la década de 1980 y se conoce que está mediada por la presencia del gen *tet(M)*, este se localiza en el transposón conjugativo Tn 916 y constituye el único determinante de resistencia a antibióticos adquirido naturalmente que se describe en micoplasmas humanos. El gen *tet(M)* codifica la proteína Tet(M) que confiere protección al ribosoma ante la acción de las tetraciclinas (Chopra I y Roberts M, 2001; Bébéar CM y Kempf I, 2005; Dégrange S *et al.*, 2008).

La prevalencia de la resistencia adquirida a tetraciclinas en *Ureaplasma* spp. varía de acuerdo a la región geográfica y a la exposición de las poblaciones a este antimicrobiano

(Krausse R y Schubert S, 2010). Con el transcurso de los años se observa un aumento en países como Francia, China y Estados Unidos (Fernández J *et al.*, 2016; Meygret A *et al.*, 2018), mientras que en los países de África Central se reafirma su efectividad para el tratamiento de infecciones por *Ureaplasma* spp. (Kouegnigan LR *et al.*, 2015).

Para *M. pneumoniae*, aunque hasta la fecha no se reporta resistencia a tetraciclinas, sí se ha logrado *in vitro*, con concentraciones sub-inhedorias de doxiciclina, la selección de aislados resistentes en los que se han demostrado mutaciones en el gen del ARNr 16S. Estas se asocian con susceptibilidad reducida a tetraciclina, doxiciclina y minociclina con CMI por debajo de 2 µg/ml (Degrange S *et al.*, 2008).

La resistencia a macrólidos en *Ureaplasma* spp. se relaciona principalmente con sustituciones de aminoácidos en las proteínas ribosomales L4 y L22, y también con mutaciones en una o ambas copias del ARNr 23S. Su frecuencia es variable en función de la región geográfica (Pereyre S *et al.*, 2007; Dongya M *et al.*, 2008; Beeton ML *et al.*, 2009a).

En *M. pneumoniae* la resistencia a macrólidos igualmente se asocia a mutaciones en el blanco ribosomal del antibiótico, como son el ARNr 23S y las proteínas ribosomales L4 y L22 (Bébéar CM y Pereyre S, 2005; Bébéar C *et al.*, 2011). La transición A2058G en el dominio V del gen del ARNr 23S es la mutación más común, pero otras sustituciones se identifican en las posiciones 2058 (A2058C, A2058T), 2059 (A2059G, A2059C), 2062 (A2062G) y 2611 (C2611G, C2611A). No se describen mutaciones en el dominio II del ARNr 23S. Las mutaciones en regiones conservadas de las proteínas ribosomales L4 y L22, tales como cambios simples de aminoácidos, inserciones y deleciones, también se relacionan en esta especie con la resistencia a macrólidos (Waites KB *et al.*, 2014).

Las primeras notificaciones de aislados de *M. pneumoniae* resistentes a macrólidos se produjeron en Japón a principios de los años 2000, con la subsecuente propagación hacia



otros países de Asia, Europa y Norteamérica (Okazaki N *et al.*, 2001; Okazaki N *et al.*, 2007; Waites KB *et al.*, 2014). Actualmente más del 90 % de los aislados de *M. pneumoniae* en algunas regiones de Japón y China son resistentes a macrólidos; y aunque en Europa la prevalencia es sustancialmente menor, varía de un país a otro, oscilando entre 0,8 y 26 % (Kogoj R *et al.*, 2018; Uldum SA *et al.*, 2012; Dumke R *et al.*, 2013; Gullsbj R *et al.*, 2019). En Estados Unidos solo se conoce de aislados resistentes por medio de reportes de casos individuales o ante infecciones diseminadas en una misma familia, pero un estudio nacional de vigilancia en ese país informa un 13,2 % de resistencia a macrólidos (Wolff BJ *et al.*, 2008; Li X *et al.*, 2009; Tsai V *et al.*, 2013; Diaz MH *et al.*, 2015a; Zheng X *et al.*, 2015).

Para las fluoroquinolonas la resistencia en el género *Ureaplasma* se debe a mutaciones en las regiones conservadas de los genes *gyrA* y *gyrB* de la ADN girasa y los genes *parC* y *parE* de la topoisomerasa IV (Beeton ML *et al.*, 2009b). En cambio, en aislados clínicos de *M. pneumoniae* hasta el momento no se reporta esta resistencia, aunque *in vitro* se ha logrado su selección y se demuestran mutaciones en las regiones conservadas de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*, las que se asocian con CMI para ciprofloxacina, levofloxacina y moxifloxacina de 32, 16 y 4 µg/ml, respectivamente (Gruson D *et al.*, 2005).

## **2.6. Métodos de determinación de la susceptibilidad de aislados de micoplasmas y ureaplasmas a los antimicrobianos.**

En el 2011 se publican métodos normalizados para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de algunas especies de micoplasmas, incluyendo *M. pneumoniae* y *Ureaplasma spp.*, que actualmente se consideran de referencia (CLSI, 2011).

La técnica de microdilución en caldo para la determinación de la CMI es el método más ampliamente utilizado para este propósito. Permite estudiar la susceptibilidad de varios antimicrobianos en una misma placa, así como determinar la concentración mínima

bactericida a partir de un subcultivo del crecimiento obtenido en esta. Para los micoplasmas la CMI se define como la menor concentración del antimicrobiano que inhibe el crecimiento y no muestra cambio de color del medio de cultivo debido al indicador de pH presente; mientras el control de crecimiento libre de antibiótico sí muestra cambio de color también por el indicador de pH presente. En el caso de *M. pneumoniae* el cambio de color del indicador se relaciona con la acidificación del medio debido a la fermentación de la glucosa. En *Ureaplasma* spp. obedece a la alcalinización del medio como consecuencia de la hidrólisis de urea (Waites KB *et al.*, 2014).

La dilución en agar que se utiliza extensivamente como método de referencia para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana en muchos tipos de bacterias, constituye también un método útil en micoplasmas, especialmente para aquellas especies que forman colonias fácilmente visibles. La CMI que se determina por esta técnica se define como la menor concentración de antibiótico que inhibe la formación de colonias, al mismo tiempo que en la placa control se demuestra crecimiento. Desde el punto de vista práctico es más laboriosa y exige del examen de las placas bajo un microscopio, pero tiene como ventaja el brindar un valor de corte relativamente estable en el tiempo, permitir la detección de cultivos mixtos y el estudio de un número amplio de aislados clínicos frente a un mismo antimicrobiano simultáneamente (Waites KB *et al.*, 2014).

En cambio, el método de difusión de discos en agar no resulta de utilidad para la determinación de la CMI en micoplasma debido a que no existe correlación entre esta y las zonas inhibitorias del crecimiento. Además, el desarrollo relativamente lento de algunas de las especies supone una limitante pues los antimicrobianos podrían difundir en el agar mucho antes de que el crecimiento microbiano pueda detectarse (Waites KB *et al.*, 2001).

Como se explicó en el acápite 2.4.1<sup>a</sup>, los sistemas diagnósticos comerciales con base en el cultivo consisten en placas con pocillos en las que también se incluye una galería con

diferentes concentraciones de antimicrobianos deshidratados. Sin embargo, generalmente estas concentraciones se corresponden con los puntos de corte establecidos para otras bacterias y no específicamente para micoplasmas (Redelinghuys MJ *et al.*, 2013; D'Inzeo T *et al.*, 2017; Morris D *et al.*, 2020).

Estos sistemas son ampliamente utilizados en países europeos y de Asia, aunque varios estudios coinciden justamente en reconocer como una de sus limitantes el hecho que utilizan concentraciones de antibióticos por debajo de las establecidas por el CLSI para definir la resistencia verdadera, y que en ninguno de ellos se utiliza un método de dilución para cuantificar adecuadamente la concentración del inóculo que se adiciona en los pocillos (Beeton ML y Spiller OB, 2016).

## **2.7. Caracterización molecular de micoplasmas y ureaplasmas.**

### **2.7.1. Métodos moleculares para la genotipificación de *M. pneumoniae*.**

*M. pneumoniae* se considera una especie altamente conservada genéticamente, ya que las comparaciones genómicas revelan más de un 99 % de similitud en las secuencias de diferentes aislados (Lluch-Senar M *et al.*, 2015; Xiao L *et al.*, 2015). En ausencia de una diversidad genética sustancial, los esfuerzos para la diferenciación de aislados se enfocan mayormente en la variabilidad de los elementos repetitivos, los cuales comprenden aproximadamente el 8 % del genoma total de *M. pneumoniae*. Varios métodos se han desarrollado sobre este fundamento y con fines epidemiológicos (Waites KB *et al.*, 2017).

#### **2.7.1a. Métodos basados en el análisis de la proteína P1.**

El tipaje basado en la variación de la secuencia de elementos repetitivos localizados en el gen que codifica la proteína de adhesión P1 se describió por primera vez en 1990, y hasta el presente constituye el método más utilizado para diferenciar los dos subtipos principales de *M. pneumoniae*, los subtipos 1 y 2. Las variaciones de secuencias entre ellos ocurren

mayormente en los elementos RepMp2/3 y RepMp4 (Dallo SF *et al.*, 1990; Su CJ *et al.*, 1990 a y b; Díaz MH y Winchell JM, 2016).

Varios métodos se describen para la genotipificación de *M. pneumoniae* basados en el análisis de la proteína P1. La primera fue la electroforesis en gel en campo pulsado, que requiere la obtención de grandes volúmenes de la bacteria para conseguir suficiente ADN genómico, y tiene un poder discriminatorio bajo en relación con otros métodos (Cousin-Allery A *et al.*, 2000; Touati A *et al.*, 2013). Los más recientes se basan fundamentalmente en la PCR e incorporan procedimientos post-PCR para detectar variaciones en las secuencias y lograr la diferenciación de los dos subtipos principales y de las variantes de estos (Dorigo-Zetsma JW *et al.*, 2000; Schwartz SB *et al.*, 2009a; Xiao J *et al.*, 2014).

Por ejemplo, para genotipificar *M. pneumoniae* directamente a partir de muestras clínicas, Dumke R y colaboradores desarrollaron un método de amplificación y secuenciación independiente del cultivo con el cual identificaron la variante V2b (Dumke R *et al.*, 2006). Por otro lado, Schwartz SB y colaboradores describieron un nuevo método de PCR con análisis de alta resolución (HRM, siglas en inglés de *High Resolution Melting*) para diferenciar ambos subtipos y sus variantes, con base en la amplificación de una secuencia de 1 900 pb, seguido de un análisis de curvas melting, todo en un solo paso de reacción. Se fundamenta en la alteración de la temperatura melting que origina el polimorfismo de un solo nucleótido localizado en el amplicón. La mayor ventaja de este método es que no requiere de una manipulación posterior al PCR, reduciendo el riesgo de contaminación (Schwartz SB *et al.*, 2009 a y b).

### **2.7.1b. Métodos basados en el análisis de las variaciones del número de secuencias repetidas en tandas (VNTR) en múltiples locus (MLVA).**

La técnica de MLVA se desarrolló en 2009 por Degrange S y colaboradores y rápidamente se convirtió en un método de clasificación adicional para *M. pneumoniae*. El esquema inicial seleccionó cinco locus (Mpn1 y Mpn13 al 16) que son polimórficos y estables después de varios pases en medio de cultivo. Utilizando este esquema se identificaron 26 tipos de MLVA que se denominaron con las letras de la A hasta la Z y utilizando un código de cinco dígitos que representan el número de repeticiones en cada locus (Degrange S *et al.*, 2009). Poco tiempo después se modificó ligeramente el protocolo de este método para permitir el análisis directamente a partir de las muestras clínicas (Dumke R y Jacobs E, 2011; Benitez AJ *et al.*, 2012).

Desde su introducción se utiliza ampliamente para la investigación de brotes, así como para la caracterización de colecciones históricas de aislados. Sin embargo, en el curso de su implementación se demostró inestable el locus Mpn1 y este se consideró no útil para la clasificación de *M. pneumoniae* (Benitez AJ *et al.*, 2012; Sun H *et al.*, 2013). Varios grupos de investigadores propusieron su exclusión como marcador y la modificación a un esquema MLVA de cuatro locus, lo que condujo a una menor cantidad de tipos únicos detectados (Sun H *et al.*, 2013; Waller JL *et al.*, 2014). No obstante, la metodología modificada se considera más robusta y se acepta en las normas internacionales para la genotipificación de *M. pneumoniae* mediante MLVA (Chalker VJ *et al.*, 2015).

### **2.7.1c. Métodos basados en el análisis de secuencias tipos en múltiples locus (MLST).**

Los primeros intentos para desarrollar este método con el propósito de la caracterización de *M. pneumoniae* utilizando genes constitutivos y estructurales fue fallido debido a las limitadas variaciones en las secuencias de estas regiones (Dumke R *et al.*, 2003). Tras el análisis de las secuencias del genoma completo de un mayor número de aislados clínicos

se desarrolló entonces un nuevo esquema de MLST, con base en el polimorfismo de ocho genes constitutivos (ppa, pgm, gyrB, gmk, glyA, atpA, arcC y adk) (Brown RJ *et al.*, 2015). Con esta metodología se identificaron 12 secuencias tipos (ST) en 57 aislados clínicos, que se asignaron a dos complejos clonales (CC). Este método no requiere del cultivo de la bacteria, pero tiene como desventaja la necesidad de realizar varias reacciones de secuenciación, lo que resulta laborioso y caro. Se sustenta en una base de datos pública (<http://pubmlst.org/mpneumoniae>) y constituye el método con mayor poder discriminatorio desarrollado para la genotipificación de *M. pneumoniae*.

### **2.7.2. Métodos moleculares para la genotipificación de *Ureaplasma* spp.**

Dos grandes metodologías se proponen para la clasificación de aislados de *Ureaplasma* a nivel de especies y de serovares. Los métodos de tipaje que se fundamentan en la detección de anticuerpos incluyeron ensayos de inhibición del crecimiento/metabolismo, la inmunofluorescencia sobre colonias recuperadas en medios con agar y los ensayos inmunoenzimáticos sobre fase sólida (ELISA, siglas en inglés de *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Estos conducen a resultados inconclusos debido a las múltiples reacciones cruzadas y por consiguiente a una pobre capacidad de discriminación (Xiao L *et al.*, 2011).

Los métodos moleculares fundamentados en la detección y caracterización del gen *mba* y su región terminal 5' se exploraron entonces para el reemplazo de los métodos fenotípicos basados en anticuerpos, y se utilizaron por casi tres décadas desde la descripción original del esquema de serotipaje por Robertson y Stemke en 1982 (Robertson JA y Stemke GW, 1982; Kong F *et al.*, 2000a y b; Cao X *et al.*, 2007). Dado los limitados datos de las secuencias obtenidas solo fue posible la identificación parcial de los serovares. En el caso de *U. parvum* los cuatro serovares fueron fácilmente diferenciados a través de un PCR convencional con diferentes juegos de cebadores o por dos RT-PCR múltiples

(Cao X *et al.*, 2007; Kong F *et al.*, 2000a). Sin embargo, para diferenciar los diez serovares de *U. urealyticum* fue preciso el desarrollo de varios PCR; los primeros permitieron la diferenciación de solamente dos grupos, con cuatro y seis serovares cada uno, y posteriormente en cinco genotipos en función del MBA. Finalmente se diseñó un ensayo genotípico más completo con base en un conjunto de PCR que permite diferenciar los 14 serovares de *Ureaplasma*. Este constituye una herramienta rápida y útil para investigar la epidemiología y patogenicidad de los ureaplasmas (Xiao L *et al.*, 2010).

Por otro lado, la técnica de MLST, alternativa ventajosa y ampliamente utilizada para la interpretación de la epidemiología molecular y la estructura poblacional de muchas especies bacterianas, se ha valorado también para la genotipificación de *Ureaplasma* spp. El primer esquema de MLST diseñado con este objetivo se fundamentó en el análisis de cuatro genes constitutivos (*ftsH*, *rpL22*, *vals* y *thrS*). Este permitió distinguir la mayoría de los serovares, agrupándolos en 12 ST, y describir más de 90 ST en los aislados clínicos estudiados, que constituyeron dos CC, los cuales se correspondían con cada una de las especies de *Ureaplasma* (Zang J *et al.*, 2014a). Posteriormente, a este esquema se incorporó el análisis de los genes *ureG* y *mba-np1*, teniendo en cuenta que la combinación de los genes constitutivos y de virulencia pueden ser más adecuados para estudios filogenéticos. De este modo los 14 serovares de *Ureaplasma* pueden diferenciarse satisfactoriamente y se asigna cada uno a una única ST (Zang J *et al.*, 2014b).

No obstante a la disponibilidad de diversos métodos moleculares para la genotipificación de *Ureaplasma* spp., que en su mayoría combinan el uso de métodos de PCR y secuenciación, estos son poco empleados pues resultan laboriosos y caros (Payne MS *et al.*, 2014). A estas desventajas se suman los criterios divergentes a nivel internacional sobre el papel patogénico de estas especies, lo que frena su empleo para conocer sobre su asociación con condiciones clínicas específicas.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Diseño general de la investigación

En el LNR-M del IPK, en el período 2012 – 2018, se ejecutó una investigación descriptiva de corte transversal en el marco de la cual se realizaron tres estudios:

- Estudio para describir los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de aislados cubanos de *Ureaplasma* spp. y *M. pneumoniae* y comparar las proporciones de aislados resistentes (Objetivo 1).
- Estudio para detectar la presencia del gen *tet(M)* en aislados de *Ureaplasma* spp. resistentes a tetraciclina y demostrar los determinantes genéticos más frecuentemente asociados a la resistencia a macrólidos y fluoroquinolonas en *Ureaplasma* spp. y *M. pneumoniae* (Objetivo 2).
- Estudio para demostrar los genotipos de *M. pneumoniae* más frecuentes y su relación con la resistencia a macrólidos. (Objetivo 3).

El diseño general de la investigación se resume en la figura 3.1.

#### 3.2. Material biológico

##### Material de referencia

Se utilizaron las cepas de referencia de *M. pneumoniae* FH (ATCC 15531), *M. pneumoniae* M129 (ATCC 29342), *U. parvum* (ATCC 27815) y *U. urealyticum* (ATCC 27618), donadas gentilmente por el Instituto Estatal del Suero, Copenhague, Dinamarca.

##### Aislados clínicos

- Se estudiaron 21 aislados de *M. pneumoniae* recuperados en el año 2012 a partir de muestras de exudado faríngeo de niños con diagnóstico clínico de neumonía intersticial, remitidas desde el Hospital Pediátrico “Juan Manuel Márquez”.

- Se estudiaron un total de 42 aislados de *Ureaplasma* spp. recuperados en el período 2013 – 2017 (3, 14, 4, 20 y 1, en cada uno de los años de estudio, respectivamente). De ellos, 32 eran de *U. parvum* y 10 de *U. urealyticum*. Estos se obtuvieron a partir de muestras urogenitales de pacientes adultos (tres hombres con uretritis inespecífica, 21 mujeres con leucorrea, cinco infértiles, seis abortadoras y seis embarazadas); en un solo caso se trató de una secreción respiratoria recuperada de un neonato con ventilación mecánica.

#### Muestras clínicas

- Se incluyeron 19 muestras de exudado faríngeo previamente demostradas como positivas a *M. pneumoniae* en el LNR-M, a través de un método de RT-PCR. Estas provenían de pacientes adultos con IRA diagnosticada durante el año 2017.
- Se estudiaron 810 muestras clínicas de pacientes con infección urogenital y respiratoria, remitidas al LNR-M del IPK durante los años 2016 al 2018 para el diagnóstico de micoplasmas: 173 muestras de orina, 439 exudados endocervical, 185 exudados uretral y 13 aspirados/secreciones respiratorias.

Las cepas de referencia, los aislados y muestras clínicas estaban conservadas a - 80 °C en el LNR-M del IPK hasta el momento de su uso en los diferentes estudios.

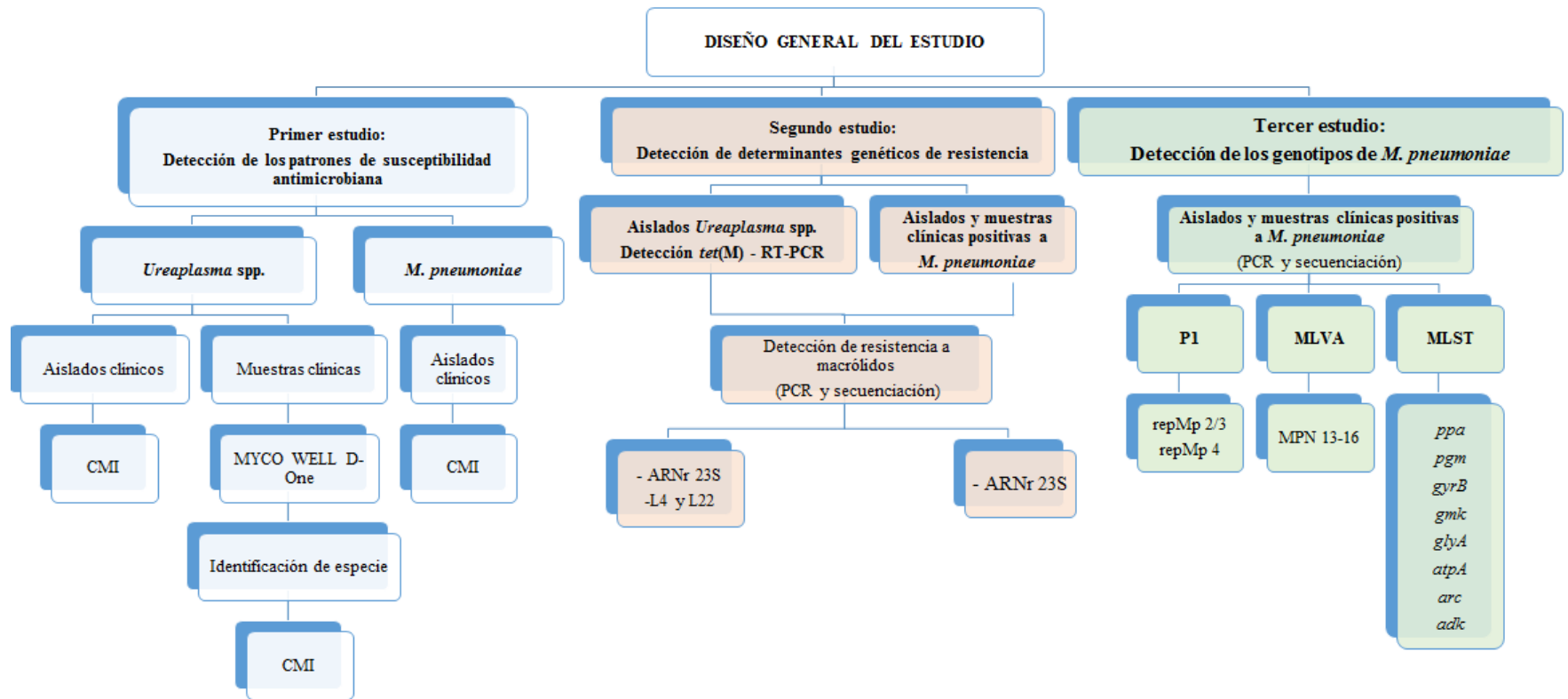


Figura 3.1. Diseño general del estudio de la resistencia a antimicrobianos en *Ureaplasma* spp. y *Mycoplasma pneumoniae*, LNR-M, 2012 – 2018.

### **3.3. Determinación de los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de aislados cubanos de *Ureaplasma* spp. y *M. pneumoniae*.**

#### **3.3.1. Determinación de los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de *Ureaplasma* spp.**

##### **3.3.1a. Perfil de susceptibilidad de los aislados de *Ureaplasma* spp.**

Se determinó la CMI de eritromicina, tetraciclina, levofloxacin y moxifloxacin (Sigma-Aldrich, Dorset, Reino Unido) para cada aislado clínico mediante la técnica de microdilución en medio líquido, siguiendo la metodología descrita por Beeton ML y colaboradores y las normas del CLSI para micoplasmas (Beeton ML *et al.*, 2009a; CLSI, 2011).

##### Preparación de las soluciones de trabajo de cada antimicrobiano.

Se prepararon las soluciones de los antimicrobianos a las concentraciones recomendadas por Beeton y colaboradores en 2009, que se corresponden con los valores de corte sugeridos por las CLSI para clasificar a los aislados como resistentes en cada caso: eritromicina [2 µg/mL], tetraciclina [16 µg/mL], levofloxacin [4 µg/mL] y moxifloxacin [4 µg/mL].

##### Determinación de la concentración óptima del inóculo para cada aislado en estudio

Los 42 aislados de *Ureaplasma* spp. conservados a - 80 °C se cultivaron en medio Shepard líquido a 37 °C entre 24 y 48 h. En una segunda etapa se adicionaron 180 µL de medio Shepard líquido en todos los pocillos de placas de poliestireno de fondo plano (Costar, Estados Unidos). Para cada aislado se destinó una columna. En el primer pocillo de cada columna se adicionó 20 µL del cultivo obtenido tras la incubación por 24 - 48 h y a partir de este se realizaron diluciones seriadas, transfiriendo siempre 20 µL de un pocillo al otro hasta el séptimo, que fueron eliminados al final de la última dilución, y siempre haciendo cambio de puntas. El octavo pocillo se reservó como control de esterilidad del medio de cultivo. La placa se cubrió con una tapa plástica y se incubó a 37 °C por 24 h.

Los aislados para los que se constató crecimiento (cambio de color del medio) para al menos cuatro diluciones del inóculo se consideraron óptimos para determinar la susceptibilidad antimicrobiana. Para ello se seleccionó la última dilución en la que se observó cambio de color del medio, correspondiente a una unidad cambiadora de color por cada microlitro de medio (UCC/  $\mu\text{L}$ ).

#### Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de los aislados

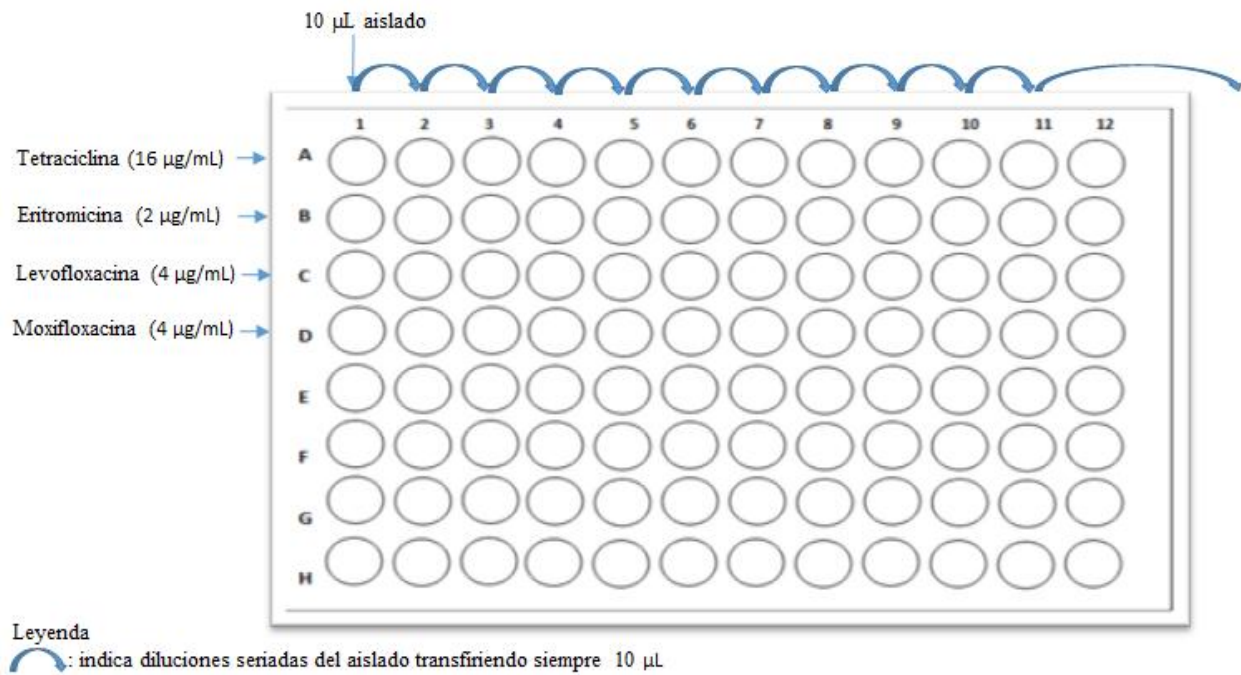
Se utilizaron placas de microdilución de 96 pocillos de poliestireno y fondo plano (Costar, Estados Unidos) y se procedió de la siguiente forma:

- Se añadieron 135  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo Shepard en los pocillos 1 al 12 de la fila A, para utilizar esta fila como control de crecimiento del aislado en cuestión.
- Se añadieron 135  $\mu\text{L}$  de la solución de tetraciclina, eritromicina, levofloxacina y moxifloxacina, previamente preparadas, en todos los pocillos de las filas B, C, D, y E, respectivamente.
- Se adicionó 10  $\mu\text{L}$  de cada aislado a la concentración óptima antes determinada (1 UCC/  $\mu\text{L}$ ), en el primer pocillo de cada una de las filas (A - E).
- Se realizaron diluciones seriadas a partir del primer pocillo y hasta el pocillo 11, transfiriendo siempre 10  $\mu\text{L}$ , que fueron eliminados al final de la última dilución.

En la figura 3.2 se muestra un esquema de la placa de microdilución.

- Las placas se sellaron y se incubaron a 37 °C hasta 48 h.
- La lectura se realizó de forma visual a partir de las 24 hrs de incubación.
  - Primero se corroboró cambio de color en la fila de control de crecimiento en el pocillo que se corresponde con  $10^4$  UCC/ $\mu\text{L}$ . Esto se interpretó como crecimiento del aislado en la concentración óptima del inóculo.

- Seguidamente se exploró, en las filas de cada uno de los antimicrobianos incluidos en la prueba, si se produjo cambio de color en el pocillo correspondiente a  $10^4$  UCC/ $\mu$ L. Se consideró como aislado resistente aquel en el cual hubo crecimiento en dicho pocillo y como sensible aquel para el que no se observó cambio de color.



**Figura 3.2. Esquema general de la placa empleada para determinar la susceptibilidad de aislados de *Ureaplasma* spp. en el LNR-M, 2013 – 2016.**

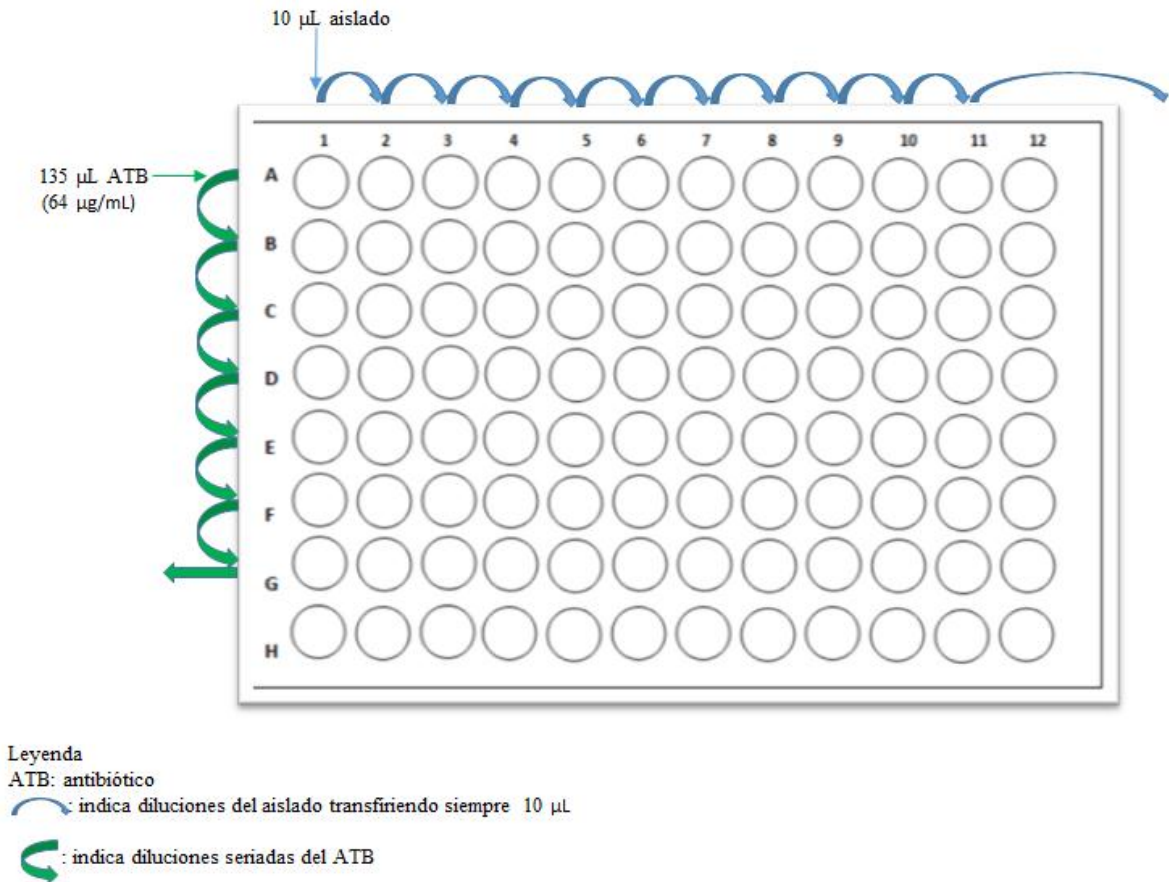
Como control se utilizó la cepa *U. urealyticum* ATCC 33175, para la cual se incluyó un ensayo en las mismas condiciones en cada jornada en la que se realizó la prueba.

#### Determinación de la CMI de los aislados demostrados como resistentes

Para cada aislado que se demostró resistente a uno o más antimicrobianos se procedió a determinar la CMI para cada uno de ellos. Se utilizaron placas de microdilución de 96 pocillos de poliestireno y fondo plano. En una placa se determinó la CMI de un solo aislado frente a un único

antimicrobiano. Se procedió de la forma que se describe a continuación y como se esquematiza en la figura 3.3.

- Se añadieron 135  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo Shepard en todos los pocillos de la placa.
- Se añadieron 135  $\mu\text{L}$  de la solución del antimicrobiano a una concentración de 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en la fila A.
- Se transfirieron 135  $\mu\text{L}$  de la primera hasta la penúltima fila para lograr diluciones dobles seriadas del antimicrobiano (64 hasta 0,06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).
- Se adicionó 10  $\mu\text{L}$  del aislado en todos los pocillos de la primera columna de la placa.
- Se transfirieron 10  $\mu\text{L}$  de la primera hasta la penúltima columna para lograr diluciones seriadas decimales del aislado.
- Las placas se sellaron y se incubaron a 37 °C hasta 48 h.
- La lectura se realizó de forma visual a partir de las 18 h de incubación.
  - Primero se corroboró cambio de color en la fila de control de crecimiento en el pocillo que se correspondió con  $10^4$  UCC/ $\mu\text{L}$ . Esto se interpretó como crecimiento del aislado en la concentración óptima del inóculo.
  - Seguidamente se exploró, en las filas de cada una de las diluciones del antimicrobiano, si se produjo cambio de color en el pocillo correspondiente a  $10^4$  UCC/ $\mu\text{L}$ . Se consideró como CMI la concentración del primer pocillo donde no se apreció cambio de color.

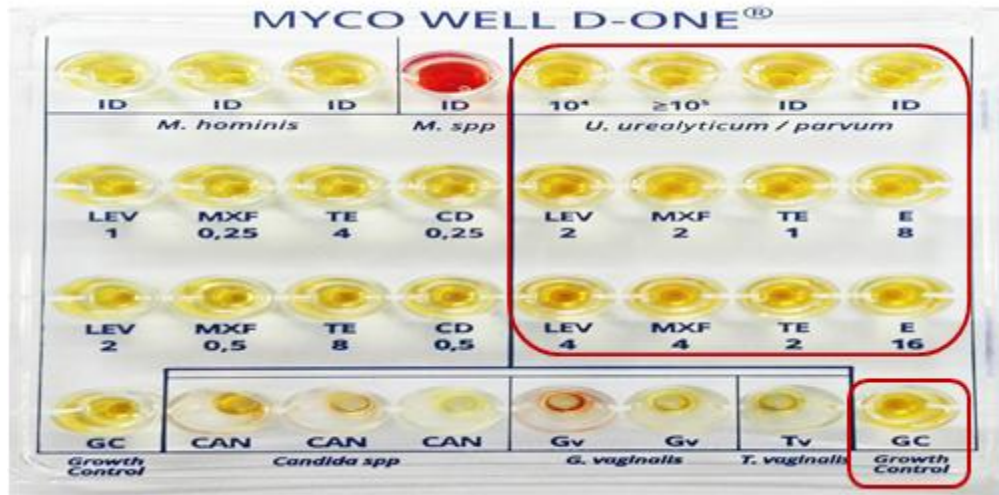


**Figura 3.3. Esquema general de la placa empleada para determinar la CMI del antibiótico que se esté analizando ante aislados de *Ureaplasma* spp. resistentes. LNR-M, 2013 – 2016.**

**3.3.1b. Perfil de susceptibilidad de *Ureaplasma* spp. inferido a partir de estudio de muestras clínicas.**

Se infirió el perfil de la susceptibilidad a tetraciclina, eritromicina, levofloxacina y moxifloxacina de *Ureaplasma* spp. a partir del estudio de 810 muestras clínicas empleando el estuche comercial MYCO WELL D- ONE (CPM Scientifica, Italia) (Figura 3.4). La sección enmarcada en rojo en la placa se corresponde con la destinada al estudio de la identificación y susceptibilidad de *Ureaplasma* spp.





**Figura 3.4. Placa sin inocular del estuche comercial MYCO WELL D-ONE, CPM Scientifica, Italia.**

Siguiendo las recomendaciones del fabricante para las muestras de exudado endocervical, uretral y faríngeo se partió de un hisopado. Este se obtuvo con un aplicador plástico, flexible y de dacrón, La muestra se colocó de 3 a 5 min en un ámpula con 10 mL de solución salina estéril, proporcionada por el fabricante como parte del estuche. El hisopo se rotó y presionó contra las paredes del ámpula hasta lograr una suspensión homogénea. Para el caso de las muestras de orina se procedió de manera similar pero partiendo de 200 µL de esta.

En todos los casos se añadieron 150 µL de la suspensión de la muestra a cada pocillo de la sección del estuche destinada a *U. urealyticum / parvum* (Figura 3.4). Se añadieron dos gotas de parafina estéril en los pocillos y se incubó a 37 °C durante 24 h, tras las cuales se procedió a la lectura. Se exploró si ocurrió cambio de color de amarillo a rojo en el pocillo para el control de crecimiento y en los pocillos destinados al diagnóstico de *U. urealyticum / parvum*; en ese caso se informó positiva la muestra en estudio. De igual forma, a través del cambio de color de pocillo, se infirió resistencia a los antimicrobianos incluidos en el estuche.

### **3.3.1c. Identificación de las especies de *Ureaplasma* a partir de las muestras informadas positivas por medio del estuche MYCO WELL D-ONE.**

Las muestras positivas a *Ureaplasma* spp. se cultivaron en medio Shepard líquido. A partir de los aislados recuperados se procedió a la identificación de *U. parvum* y *U. urealyticum* a través de una RT-PCR basada en la detección de polimorfismos especie-específicos en el gen de la ureasa (Payne MS *et al.*, 2012).

Para la extracción de ADN se utilizó el estuche comercial QIAamp DNA Mini (QIAGEN, Alemania), según el protocolo recomendado por el fabricante.

El volumen final de la reacción de PCR fue de 25  $\mu$ L (20  $\mu$ L de mezcla más 5  $\mu$ L de ADN de la muestra). Cada mezcla contenía 1X de Tampón de PCR (QIAGEN, Alemania); 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (QIAGEN, Alemania); 200 nM de cada deoxinucleótido trifosfato (dNTP) (QIAGEN, Alemania); 500 nM de cada cebador, 200 nM de cada sonda, 2 U de Top-*Taq*-polimerasa (QIAGEN, Alemania) y suficiente agua ultrapura para completar un volumen de 20  $\mu$ L. Los cebadores y las sondas se describen en el Anexo 1.

Como controles positivos se utilizaron las cepas de referencia *U. parvum* (ATCC 27815) y *U. urealyticum* (ATCC 27618) y agua ultrapura como control negativo.

La amplificación y el análisis de los resultados se realizó en un equipo Rotor Gene Q 5-Plex-HRM (QIAGEN, Alemania), utilizando un programa de un ciclo de desnaturalización inicial de 95 °C durante 10 min, seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 15 seg y 60 °C durante 1 min. La lectura se realizó en el canal de fluorescencia correspondiente al marcaje de cada sonda utilizada. Se consideró como muestra positiva aquella cuya amplificación mostró una amplificación exponencial a partir de un ciclo umbral (Ct, siglas en inglés de *Cycle threshold*) de 23.

**3.3.1d. Confirmación de la resistencia antimicrobiana de los aislados de *Ureaplasma* spp. recuperados a partir de las muestras informadas resistentes por medio del estuche MYCO WELL D-ONE.**

Para la confirmación de la resistencia de los aislados recuperados por medio del estuche MYCO WELL D-ONE se siguió el mismo procedimiento descrito en el acápite 3.3.1a. Se estudiaron además 12 aislados recuperados de muestras informadas como sensibles.

**3.3.2. Determinación de los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados de *M. pneumoniae*.**

Se determinó la CMI de azitromicina, eritromicina, tetraciclina, levofloxacina y moxifloxacina (Sigma-Aldrich, Dorset, Reino Unido) para cada aislado clínico mediante la técnica de microdilución en medio líquido, siguiendo la metodología descrita en las normas del CLSI para *M. pneumoniae* (CLSI, 2011).

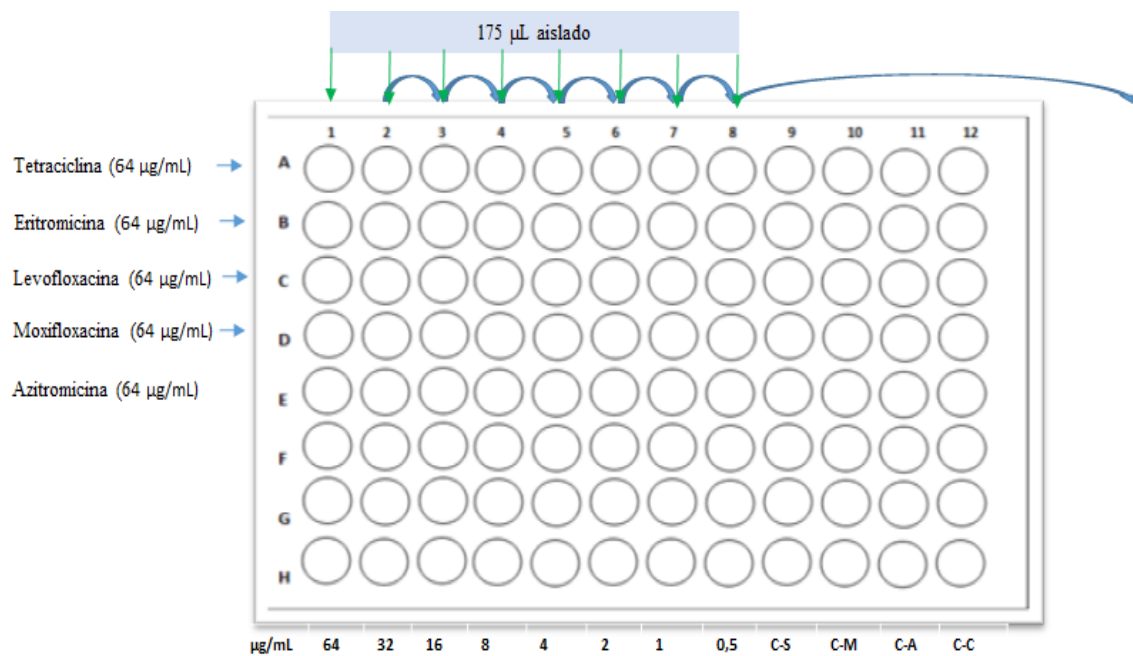
Las soluciones de trabajo de cada antimicrobiano se prepararon a una concentración inicial de 64 µg/mL. La concentración microbiana del inóculo se ajustó a  $10^4$  -  $10^5$  UFC/mL. Para cada aislado en estudio y la cepa de referencia se prepararon seis tubos con 0,9 mL del medio SP4 líquido. Al primero se añadieron 0,1 mL de un cultivo del aislado de 72 h obtenido en medio SP4 líquido y a partir de este se realizaron diluciones seriadas transfiriendo 0,1 mL de un tubo al otro, siempre haciendo cambio de puntas. De cada dilución se tomaron 20 µL y se inocularon en placas de Petri con medio SP4 sólido y estas se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> por seis días. Se procedió entonces al conteo de colonias y se seleccionó la dilución para la que se obtuvieron entre 30 y 300 colonias. Se determinó la cantidad de UFC multiplicando por 50 y por el factor de dilución correspondiente.

Se utilizaron placas de microdilución de 96 pocillos de poliestireno y fondo plano (Costar, Estados Unidos) que se prepararon de la forma que se describe a continuación y como se representa en la figura 3.5. Para cada aislado se utilizó una placa.

- Se añadieron 25  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo SP4 en los pocillos del 1 al 8, 10 y 12 en cinco filas para cada aislado.
- Se adicionaron 25  $\mu\text{L}$  de la solución de azitromicina, eritromicina, levofloxacina, moxifloxacina y tetraciclina en los pocillos 1 y 11 de las filas A, B, C, D y E, respectivamente. El pocillo 11 de las respectivas filas se utilizó para verificar la esterilidad del antibiótico.
- Se realizaron diluciones seriadas dobles a partir del pocillo 1 hasta el pocillo 8, variando la concentración de los antibióticos desde 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  hasta 0,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se desecharon los últimos 25  $\mu\text{L}$  de solución de antimicrobiano.
- Para verificar la esterilidad del solvente utilizado para cada antimicrobiano, 25  $\mu\text{L}$  de este se adicionaron al pocillo 9.
- Se adicionaron 175  $\mu\text{L}$  del inóculo de cada aislado en los pocillos del 1 al 8 y en el 12. Este último se utilizó como control de crecimiento. Se comenzó a inocular a partir del pocillo 12 y hasta el 1 para evitar variar la concentración en cada pocillo por medio del arrastre del antibiótico.
- Se adicionó 175  $\mu\text{L}$  del medio de cultivo a los pocillos 10 y 11 para igualar el volumen final en todos los pocillos de la placa.

Se utilizó como control de la prueba la cepa de referencia *M. pneumoniae* ATCC 15492, que es sensible a todos los antimicrobianos en estudio (CLSI, 2011).

Las placas de microdilución se cubrieron con tapas plásticas y se incubaron a 37 °C hasta 5 días. La lectura se realizó de forma visual diariamente hasta observar cambio de color en el pocillo de control de crecimiento del aislado. Se consideró como CMI la concentración del pocillo en el que no se observó cambio de color en el mismo tiempo de incubación en que sí se registró cambio en el pocillo del control de crecimiento. Para el informe de los resultados se utilizaron los criterios de interpretación de la CLSI, 2011.



**Leyenda**  
 : indica diluciones del antibiótico  
 : indica adición del aislado en cada pocillo  
 C-S: control del solvente  
 C-M: control del medio  
 C-A: control del antibiótico  
 C-C: control de crecimiento del aislado

**Figura 3.5.** Esquema general de la placa empleada para determinar los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados de *M. pneumoniae*. LNR-M, 2012.

### **3.4. Demostración de los mecanismos moleculares asociados a la resistencia a tetraciclina y macrólidos en *Ureaplasma spp.* y *Mycoplasma pneumoniae*.**

#### **3.4.1. Detección del gen *tet(M)* en aislados de *Ureaplasma spp.***

Se utilizó una RT-PCR cuantitativa para la amplificación de un fragmento conservado del gen *tet(M)*, utilizando los cebadores y sondas diseñados por Spiller y colaboradores, donados al LNR-M por el laboratorio de Micoplasmas de la Unidad de Resistencia Antimicrobiana de la Universidad de Cardiff, Gales (datos no publicados, anexo 1). Se procesaron por esta técnica el total de los aislados de *Ureaplasma spp.* incluidos en el estudio (42 aislados) y el total de los recuperados de las muestras clínicas utilizando el MYCO WELL D-ONE (220 aislados), independientemente de que a través de este se demostraran sensibles o resistentes a la tetraciclina.

La extracción de ADN de los aislados se realizó mediante el estuche comercial QIAamp DNA Mini (QIAGEN, Alemania) según el protocolo recomendado por el fabricante. Esto no fue necesario para los recuperados de las muestras clínicas que se procesaron en el marco del estudio porque se partió del mismo material genético extraído previamente (acápites 3.3.2c).

El volumen final de reacción fue de 25  $\mu$ L (20  $\mu$ L de mezcla más 5  $\mu$ L de muestra). Cada mezcla contenía 1X de Tampón de PCR (QIAGEN, Alemania); 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (QIAGEN, Alemania); 200 nM de cada dNTP (QIAGEN, Alemania); 100 nM de cada cebador, 50 nM de la sonda y suficiente agua ultrapura para completar un volumen de 20  $\mu$ L. Los cebadores y la sonda se describen en el Anexo 1.

La amplificación y el análisis de los resultados se realizó en un equipo Rotor Gene Q 5-Plex-HRM (QIAGEN, Alemania), utilizando un programa de un ciclo de desnaturalización inicial de 95 °C durante 10 min, seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 15 seg y 60 °C durante 1 min. La

lectura se realizó en el canal de fluorescencia correspondiente al marcaje de la sonda. Se consideró como muestra positiva aquella que mostró una amplificación exponencial a partir de un ct de 23.

### **3.4.2. Detección de determinantes genéticos de resistencia a macrólidos.**

#### **3.4.2a. Detección de las mutaciones específicas que confieren resistencia a macrólidos en *Ureaplasma spp.***

Se realizaron cuatro PCR a punto final partiendo de las extracciones de ADN previamente obtenidas de los aislados demostrados como resistentes por el método de CMI, (subacápite 3.3.1c) para la amplificación de fragmentos de la subunidad II y V del gen del ARNr 23S y de las regiones conservadas de las proteínas ribosomales L4 y L22. Se siguió la metodología descrita por Pereyre S y colaboradores en 2007.

Para cada aislado demostrado como resistente a macrólidos por el método de CMI, partiendo de las extracciones de ADN previamente obtenidas (subacápite 3.3.1c), se realizaron cuatro PCR a punto final para la amplificación de fragmentos de la subunidad II y V del gen del ARNr 23S y de las regiones conservadas de las proteínas ribosomales L4 y L22. Se siguió la metodología descrita por Pereyre S y colaboradores en 2007.

En todos los casos el volumen final de reacción fue de 25  $\mu$ L (20  $\mu$ L de mezcla más 5  $\mu$ L de ADN de la muestra). La mezcla contenía una unidad de enzima HotStarTaq Plus DNA Polymerase (QIAGEN, Alemania), 1X de Tampón de PCR (1,5 mM de  $MgCl_2$ ), 200 nM de cada dNTP (QIAGEN, Alemania); 500 nM de cada cebador, y suficiente agua ultrapura estéril hasta alcanzar el volumen final. Los cebadores se describen en el Anexo 1.

La amplificación se realizó en un equipo “Mastercycler personal” (Eppendorf, Alemania), con un programa de amplificación similar en todos los casos: un ciclo de desnaturalización de 95 °C

durante 5 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 1 min y 60 °C durante 30 seg (excepto en el PCR para amplificar el fragmento del dominio II donde se utilizó 56 °C y 72 °C durante 1 min, seguido por una extensión final a 72 °C durante 5 min.

Los productos amplificados se visualizaron en electroforesis submarina en gel de agarosa al 2 % y Tris-Borato-EDTA 0,5 X como tampón de corrida. La cámara electroforética GNA 100 (Pharmacia Biotech, Suecia) acoplada a la fuente EPS 301 (Amersham Biosciences, Suecia), se ajustó a una diferencia de potencial de 110 V con una intensidad de corriente de 90 mA durante 30 min. Se empleó el patrón de peso molecular de 100 pb (Promega, Madison, EUA), como colorante de corrida electroforética 5X Green GoTaq Flexi Buffer (Promega, Madison, EUA) y bromuro de etidio [1 µg/mL] como agente intercalante del ADN. Todos los productos de las PCR anteriores se purificaron mediante el estuche QIAEX II (QIAGEN, Alemania) de forma automática, y se utilizó el equipo QIAcube (QIAGEN, Alemania) según las recomendaciones del fabricante.

Las reacciones de secuencia (una con cada cebador de la PCR anterior) se prepararon en viales criogénicos de pared fina de 0,2 mL. Los reactivos se mantuvieron en hielo mientras se preparó la reacción. Para ello se añadieron 3,5 µL de agua ultrapura y 0,5 µL del cebador en cuestión, más 8 µL de la mezcla maestra (DTCS Quick Start Master Mix) y 8 µL del producto de PCR purificado para completar 20 µL de volumen final.

La amplificación se realizó en un equipo Rotor Gene Q 5-plex HRM (QIAGEN, Alemania) sin lectura en ningún canal de fluorescencia, con un programa de 40 ciclos a 96 °C durante 20 seg, 50 °C durante 20 seg y 60 °C durante 4 min.

Posteriormente se procedió a la precipitación con etanol para la cual se preparó una mezcla de glucógeno/solución de parada, que para cada reacción de secuencia contenía 2 µL de acetato de



sodio al 3 M (pH 5,2), 2 µL Sodio-EDTA a 100 mM (pH 8) y 1 µL de glucógeno [20 mg/mL]. Se añadieron 5 µL de la mezcla de glucógeno/solución de parada a cada tubo de reacción. Se transfirió la reacción de secuencia a un tubo de microcentrífuga previamente identificado y se mezcló mediante vortex, después se añadieron 60 µL de etanol absoluto al 95 % frío y se agitó. A continuación se centrifugó a 4 °C durante 15 min a 14 000 rpm en una centrífuga Eppendorf (Fisher Scientific, Alemania) y se descartó cuidadosamente el sobrenadante. El sedimento se lavó dos veces con 200 µL de etanol al 70 % y se agitó usando el vortex. Después de cada lavado se centrifugó a 14 000 rpm a 4 °C por 15 min. El sobrenadante se eliminó con precaución y el sedimento se dejó secar por 10 min. Finalmente, este se resuspendió en 40 µL del tampón de corrida (formamida).

Cada muestra a secuenciar se transfirió a un pocillo en la placa de secuenciación y este se cubrió con una gota de aceite mineral. Las reacciones se analizaron en el secuenciador ABI PRISM 377 (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos) mediante electroforesis capilar, y se utilizó el método corto de secuenciación (Sanger F y Coulson AR, 1975).

Las secuencias se analizaron mediante el programa ChromasPro (versión 1.7.4, Biotech Works) y se compararon con las secuencias de las cepas de referencia *U. parvum* serotipo 3 (ATCC 27815) y *U. urealyticum* serotipo 8 (ATCC 27618) publicadas en GenBank (Número de acceso NC\_010503 y NZ\_AAYN02000002.1, respectivamente).

#### **3.4.2b. Detección de las mutaciones específicas que confieren resistencia a macrólidos en *M. pneumoniae*.**

La amplificación parcial del gen del ARNr 23S de los 21 aislados clínicos analizados por el método de CMI, así como de las 19 muestras clínicas positivas a *M. pneumoniae* se realizó mediante una PCR anidada, siguiendo la metodología descrita por Dumke R y colaboradores en

2010. La extracción de ADN se realizó utilizando el estuche comercial QIAamp DNA Mini (QIAGEN, Alemania), según el protocolo recomendado por el fabricante.

Para la primera amplificación se utilizó como volumen final de reacción 50  $\mu$ L (48  $\mu$ L de mezcla más 2  $\mu$ L de ADN de la muestra). La mezcla contenía una unidad de enzima HotStarTaq Plus DNA Polymerase (Qiagen, Alemania), 1X de Tampón de PCR (1,5 mM de  $MgCl_2$ ), 200 nM de cada dNTP (Qiagen, Alemania); 300 nM de cada cebador (Anexo 1) y suficiente agua ultrapura estéril hasta alcanzar el volumen final.

La amplificación se realizó en un equipo “Mastercycler personal”. (Eppendorf, Alemania), utilizando el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 2 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 45 seg, 55 °C durante 1 min y 72 °C durante 80 seg, seguido por una extensión final a 72 °C durante 5 min. La visualización de los productos de amplificación de 885 pb se realizó por una electroforesis submarina en gel de agarosa como se describió en el acápite 3.4.1a.

A partir del producto amplificado se realizó la PCR anidada, utilizando los cebadores que se describen en el Anexo 1. La mezcla de reacción se preparó igual a la del PCR anterior y se utilizó el mismo programa de amplificación. Los productos amplificados se visualizaron tal como se describió anteriormente.

Para la secuenciación de los fragmentos amplificados se utilizó la misma metodología descrita en el acápite 3.4.1b. Las secuencias se analizaron utilizando el programa Sequencher 4.10.1 (Genes Code Corporation, EUA), y se compararon con la de la cepa de referencia *M. pneumoniae* M129 (ATCC 29342) publicada en GenBank (Número de acceso NC\_000912; Gene ID 876745).

### **3.5. Detección de genotipos de *M. pneumoniae*.**

#### **3.5.1. Determinación de genotipos mediante análisis de la proteína de adhesión P1.**

La genotipificación de *M. pneumoniae* se realizó en el Laboratorio de Micoplasmas de la Unidad de Resistencia Antimicrobiana de la Universidad de Cardiff, Gales; siguiendo la metodología descrita por Dumke R y colaboradores en 2006 para la amplificación de fragmentos del elemento repetitivo repMp2/3, localizado en la proteína de adhesión P1 de *M. pneumoniae*, que permiten la identificación de los subtipos 1, 2, V2a, V2b y V2d. Adicionalmente, se realizó la amplificación de un fragmento del elemento repetitivo repMp4, también localizados en la proteína P1, para la identificación de la variante V2c, siguiendo la metodología descrita por Gullsby y colaboradores en 2019.

Se utilizaron los extractos de ADN de los aislados y muestras clínicas obtenidos previamente (acápite 3.4.2a.).

#### **3.5.1a. PCRs anidadas para la amplificación de fragmentos del elemento repMp2/3 del gen de la proteína P1 de *M. pneumoniae*.**

Se realizó una PCR anidada para amplificar un fragmento del extremo 5' del elemento repMp2/3 del gen de la proteína P1. Para la primera amplificación el volumen final de reacción fue de 25  $\mu$ L (22,5  $\mu$ L de mezcla más 2,5  $\mu$ L de ADN de la muestra). La mezcla contenía 10X de tampón de PCR (Promega, Madison, Estados Unidos), 200 nM de cada dNTP (HYBAID-AGS, Heidelberg, Germany), 1U de enzima AmpliTaq (Promega, Madison, Estados Unidos), 100 nM de cada cebador (Anexo 1) y suficiente agua ultrapura estéril hasta alcanzar el volumen final.

La amplificación del ADN se realizó en un termociclador “Mastercycler personal” (Eppendorf Alemania) utilizando un programa de amplificación de un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 60 seg, 58 °C durante 60 seg y 72 °C

durante 3 min, seguido por una extensión final a 72 °C durante 10 min. Para la visualización de los productos de amplificación se realizó una electroforesis submarina en gel de agarosa según se describió en el acápite 3.4.1a.

A partir de 1 µL del producto amplificado se realizó la PCR anidada utilizando los cebadores específicos (Anexo1). La mezcla de reacción se preparó con las mismas condiciones de la PCR anterior, y se utilizó el mismo programa de amplificación variando a 30 el número de ciclos. Los productos amplificados se visualizaron tal como se describió anteriormente.

Por otro lado, se realizó una PCR anidada para amplificar un fragmento del extremo 3´ del elemento repMp2/3 del gen de la proteína P1. La mezcla de reacción se preparó con las mismas condiciones de las PCR anteriores, utilizando los cebadores descritos en el anexo 1. Se utilizó un programa similar, variando solamente la temperatura de desnaturalización a 60 °C.

A partir de 1 µL del producto amplificado se realizó la PCR anidada utilizando los cebadores específicos (Anexo 1). La mezcla de reacción se preparó con las mismas condiciones de la PCR anterior, y se utilizó el mismo programa de amplificación. Los productos amplificados se visualizaron tal como se describió anteriormente.

### **3.5.1b. PCR anidada para la amplificación de fragmentos del elemento repMp4 del gen de la proteína P1 de *M. pneumoniae*.**

Se realizó una PCR anidada para amplificar un fragmento del extremo 3´ del elemento repMp4 del gen de la proteína P1. Para la primera amplificación se preparó la mezcla de reacción con las mismas condiciones de las PCR descritas en el acápite 3.5.1a, utilizando los cebadores específicos (Anexo 1), y se empleó un programa de amplificación similar en el que solo varió la temperatura de desnaturalización (62 °C).

A partir de 1  $\mu$ L del producto amplificado se realizó la PCR anidada utilizando los cebadores descritos en el anexo 1. La mezcla de reacción se preparó con las mismas condiciones de la PCR anterior y se empleó un programa de amplificación similar, pero en este caso con una temperatura de desnaturalización de 60 °C. Los productos amplificados se visualizaron tal como se describió anteriormente.

### **3.5.1c. Secuenciación y análisis de los resultados.**

Todos los productos de las PCR anidadas se secuenciaron utilizando la metodología descrita en el acápite 3.4.1b. Las secuencias se ensamblaron utilizando el programa SeqMan y MegAlign y la traducción de proteínas se realizó con la herramienta EditSeq del programa DNASTar (DNASTAR Inc., Madison, WI), utilizando la tabla de código de *Mycoplasma*. Las secuencias se compararon con las de la cepa de referencia *M. pneumoniae* M129 (subtipo1, número de acceso M18639), cepa 1842 (subtipo 2, AF290002), variante 2a (AB024618.1), variante 2b (DQ383277.1), variante 2c (JN048895) y variante 2d (EF656612), depositadas en el GenBank.

### **3.5.2. Determinación de genotipos mediante el análisis de las variaciones del número de secuencias repetidas en tandas (VNTR) en múltiples locus (MLVA) de *M. pneumoniae*.**

Se determinaron los genotipos de *M. pneumoniae* siguiendo la metodología descrita por Dumke R y colaboradores en 2011, y Chalker VJ y colaboradores en 2015, para la determinación del número de secuencias repetidas en los cuatro locus (Mpn13, 14, 15 y 16; Anexo 2). Se utilizaron los extractos de ADN previamente obtenidos de los aislados y muestras clínicas (acápite 3.4.2a).

#### **3.5.2a. PCRs anidadas para la amplificación de cuatro locus de *M. pneumoniae*.**

Se realizaron cuatro PCR anidadas para la amplificación de los cuatro locus seleccionados utilizando los cebadores descritos en el anexo 1. La primera amplificación para cada locus se realizó en un volumen final de reacción de 50  $\mu$ L (45  $\mu$ L de mezcla más 5  $\mu$ L de ADN de la

muestra). La mezcla contenía 10 X de tampón de PCR (Promega, Madison, Estados Unidos), 200 nM de cada dNTP (HYBAID-AGS, Heidelberg, Alemania), 1 U de enzima AmpliTaq (Promega, Madison, WI), 100 nM de cada cebador y suficiente agua ultrapura estéril hasta alcanzar el volumen final.

La amplificación del ADN se realizó en un termociclador “Mastercycler personal” (Eppendorf, Alemania), utilizando un programa de amplificación de un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 60 seg, 61 °C durante 60 seg y 72 °C durante 60 seg, seguido por una extensión final a 72 °C durante 5 min. Para la visualización de los productos de amplificación se realizó una electroforesis submarina en gel de agarosa como se describe en el acápite 3.4.1a.

A partir de 2 µL del producto amplificado se realizó la PCR anidada siguiendo el mismo modo de preparación de la mezcla. Los productos amplificados se analizaron de la misma forma en que se describe anteriormente.

### **3.5.2b. Secuenciación y análisis de los resultados.**

Todos los productos de las PCR anidadas se secuenciaron utilizando la metodología descrita en el acápite 3.4.1b. Las secuencias se analizaron mediante el software BioNumerics (versión 6.5) y se compararon con las secuencias depositadas en la base de datos de GenBank.

### **3.5.3. Determinación de genotipos mediante el análisis de las secuencias tipos en múltiples locus (MLST) de *M. pneumoniae*.**

Se determinaron los genotipos de *M. pneumoniae* siguiendo la metodología descrita por Brown RJ y colaboradores en 2015, para la detección de polimorfismos en las secuencias de ocho genes constitutivos (*ppa*, *pgm*, *gyrB*, *gmk*, *glyA*, *atpA*, *arcC* y *adk*; Anexo 2). Se utilizaron los extractos de ADN previamente obtenidos de los aislados y de las muestras clínicas (acápites 3.4.2a).

### **3.5.3a. PCRs simples para la amplificación de los genes constitutivos de *M. pneumoniae* seleccionados para el análisis.**

Se realizaron ocho PCR simples para la amplificación de fragmentos de los genes seleccionados, utilizando los cebadores descritos en el anexo 1. Se utilizó para cada caso un volumen final de reacción de 50  $\mu$ L (47,5  $\mu$ L de mezcla más 2,5  $\mu$ L de ADN de la muestra). La mezcla contenía 10X de tampón de PCR (Promega, Madison, WI), 200 nM de cada dNTP (HYBAID-AGS, Heidelberg, Alemania), 1 U de enzima AmpliTaq (Promega, Madison, Estados Unidos), 500 nM de cada cebador y suficiente agua ultrapura estéril hasta alcanzar el volumen final.

La amplificación del ADN se realizó en un termociclador “Mastercycler personal” (Eppendorf, Alemania) utilizando un programa de amplificación de un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min, 35 ciclos de 94 °C por 60 seg, 60 °C durante 60 seg y 72 °C durante 60 seg, seguido por una extensión final a 72 °C durante 10 min. Para la visualización de los productos se realizó tal como se describe en el acápite 3.4.1a.

### **3.5.3b. Secuenciación y análisis de los resultados.**

Todos los productos de las PCR se secuenciaron utilizando la metodología descrita en el acápite 3.4.1b. Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias depositadas en la base de datos de MLST de *M. pneumoniae*, utilizando el software MegAlign (DNASar, version 15).

### **3.5.3c. Análisis filogenético.**

Se realizó un árbol filogenético de máxima verosimilitud mediante el programa Mega 6 (Tamura K y col, 2013) a partir de la concatenación de los *loci* ppa, pgm, gyrB, gmk, glyA, atpA, arcC y adk de *M. pneumoniae*, utilizando el modelo de Tamura-Nei con valores de bootstraps para 1000 réplicas.

### **3.6. Aspectos éticos de la investigación**

Los estudios que conformaron esta investigación constituyeron tareas del proyecto asociado a programa del Ministerio de salud pública (Minsap) con título “Infecciones por Micoplasmas y Ureaplasmas: Enfoque integral para el diagnóstico, tratamiento y control en la salud pública cubana”, aprobado por la Comisión Científica Especializada de Microbiología y el Comité de Ética de la Investigación del IPK (CEI-IPK 33-12).

El manejo de la información sobre los datos demográficos (edad y sexo) y clínicos de los pacientes y las muestras incluidas en la investigación fue confidencial. En el LNR-M del IPK se tuvieron en cuenta las prácticas y procedimientos que corresponden al nivel de seguridad biológica II, según establece la Resolución No. 103 del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente del 2002, pues *Mycoplasma* spp. y *Ureaplasma* spp. se incluyen entre los agentes biológicos con riesgo individual moderado y comunitario limitado (CITMA, 2006).



## **IV. RESULTADOS**

## 4. Resultados.

### 4.1. Susceptibilidad a antimicrobianos de aislados cubanos de *Ureaplasma* spp. y *M. pneumoniae*.

#### 4.1.1. Perfil de susceptibilidad a antimicrobianos de *Ureaplasma* spp.

##### 4.1.1a. Perfil de susceptibilidad a antimicrobianos de aislados de *Ureaplasma* spp.

A través del método de microdilución en caldo para la determinación de la CMI de los antimicrobianos recomendados para el tratamiento, se demostraron cinco aislados resistentes entre los 42 estudiados (11,9 %). Dos aislados de *U. parvum* mostraron resistencia a tetraciclina (CMI = 4 y 16 µg/mL) y uno a eritromicina (CMI = 64 µg/mL); así mismo dos aislados de *U. urealyticum* fueron resistentes a eritromicina (CMI = 16 y 32 µg/mL). Cuatro de estos aislados se recuperaron de exudados endocervical y uno a partir del aspirado respiratorio de un neonato ventilado (Tabla 4.1). Para la levofloxacina y moxifloxacina todos los aislados fueron sensibles.

**Tabla 4.1. Aislados de *Ureaplasma* spp. resistentes a antimicrobianos, LNR-M, 2013 – 2017.**

| Nº aislado (año) | Muestra de procedencia    | Especie               | Resistencia demostrada | CMI µg/mL |
|------------------|---------------------------|-----------------------|------------------------|-----------|
| 681 (2013)       | Exudado endocervical      | <i>U. parvum</i>      | Tetraciclina           | 4         |
| 211 (2014)       | Exudado endocervical      | <i>U. parvum</i>      | Tetraciclina           | 16        |
| 189 (2016)       | Exudado endocervical      | <i>U. urealyticum</i> | Eritromicina           | 32        |
| 192 (2016)       | Exudado endocervical      | <i>U. urealyticum</i> | Eritromicina           | 16        |
| 106 (2017)       | Aspirado traqueal/neonato | <i>U. parvum</i>      | Eritromicina           | 64        |

#### 4.1.1b. Perfil de susceptibilidad de *Ureaplasma* spp. a partir de las muestras clínicas.

El estudio de las 810 muestras clínicas empleando el estuche comercial MYCO WELL D-ONE permitió demostrar 220 muestras (27,2 %) positivas a *Ureaplasma* spp. A partir de las muestras de exudados endocervical se revelaron un número mayor de muestras positivas (36,7 %) (Tabla 4.2).

**Tabla 4.2. Proporción de muestras positivas a *Ureaplasma* spp. utilizando el estuche diagnóstico MYCO WELL D-ONE. LNR-M, 2016 – 2018.**

| Tipo de muestra                              | Muestras positivas |             |
|--|--------------------|-------------|
|  | n                  | %           |
| Orina (n = 173)                              | 26*                | 15          |
| Exudado endocervical (n = 439)               | 161                | 36,7        |
| Exudado uretral (n = 185)                    | 30                 | 16,2        |
| Aspirados/secreciones respiratorias (n = 13) | 3                  | 23,1        |
| <b>Total (n = 810)</b>                       | <b>220</b>         | <b>27,2</b> |

\* 13 muestras procedían de hombres y 13 de mujeres

Asimismo, el empleo del estuche comercial MYCO WELL D-ONE permitió informar resistencia en un total de 71 (32,3 %) muestras y se observaron nueve patrones de resistencia (Tabla 4.3).

**Tabla 4.3. Patrones de resistencia a antimicrobianos demostrados a partir del estudio de muestras positivas (220) utilizando el MYCO WELL D-ONE. LNR-M, 2016 – 2018.**

| Patrones de resistencia                             | Muestras en las que se demostró resistencia |             |
|---|---|-------------|
|   | n   | %           |
| Eritromicina  | 27  | 12,3        |
| Tetraciclina  | 26  | 11,8        |
| Tetraciclina+Eritromicina                           | 9   | 4,1         |
| Levofloxacin  | 4   | 1,8         |
| Levofloxacin+Tetraciclina                           | 1   | 0,5         |
| Levofloxacin+Moxifloxacin                           | 1   | 0,5         |
| Tetraciclina+moxifloxacin                           | 1   | 0,5         |
| Eritromicina+tetraciclina+levofloxacin              | 1   | 0,5         |
| Eritromicina+tetraciclina+levofloxacin+moxifloxacin | 1   | 0,5         |
| <b>Total</b>  | <b>71</b>                                   | <b>32,3</b> |

Partiendo de los pocillos de control de crecimiento de las 220 muestras que se demostraron positivas para *Ureaplasma* spp., se lograron recuperar por cultivo e identificar por RT-PCR un total de 187 aislados como *U. parvum* y 33 como *U. urealyticum*. La especie que predominó en las muestras obtenidas de pacientes femeninas con diferentes diagnósticos clínicos fue *U. parvum* y también en las provenientes de neonato. En cambio, *U. urealyticum* fue más frecuente en las muestras de los pacientes masculinos con uretritis inespecíficas (Tabla 4.4).

**Tabla 4.4. Frecuencia absoluta de *U. parvum* y *U. urealyticum* en el total de muestras positivas a *Ureaplasma* spp. mediante el estuche MYCO WELL D-ONE.**

| Diagnóstico clínico                                | Muestras positivas (220) |                       |
|--|--------------------------|-----------------------|
|  | <i>U. parvum</i>         | <i>U. urealyticum</i> |
| Mujeres con leucorrea (113)                        | 111                      | 2                     |
| Mujeres infértiles (38)                            | 36                       | 2                     |
| Mujeres abortadoras (23)                           | 22                       | 1                     |
| Hombres con uretritis inespecífica (43)            | 15                       | 28                    |
| Neonatos ventilados con infección respiratoria (3) | 3                        | 0                     |
| <b>Total (220)</b>                                 | <b>187</b>               | <b>33</b>             |

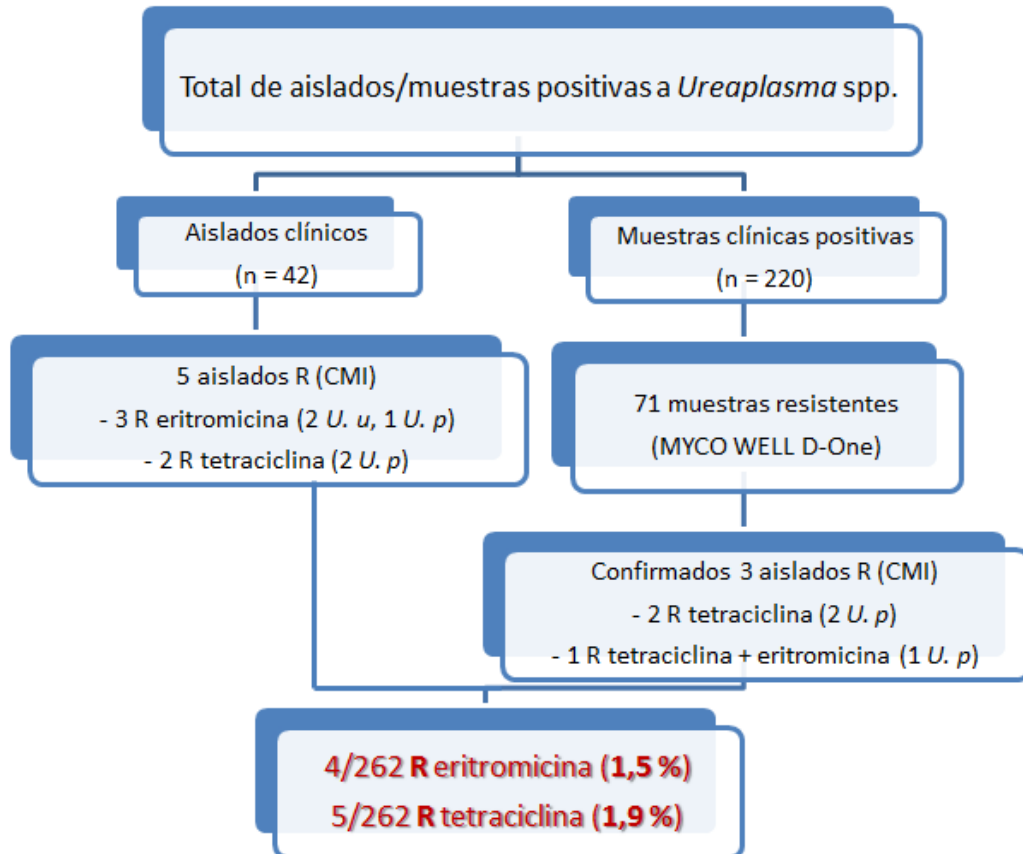
**4.1.1c. Confirmación de la resistencia antimicrobiana de los aislados recuperados a partir de las muestras informadas resistentes por el estuche MYCO WELL D-ONE.**

A partir de las 71 muestras informadas como resistentes por el estuche MYCO WELL D-ONE, se confirmaron dos aislados resistentes a tetraciclina (2/26) mediante el método de microdilución en caldo, así como un aislado resistente a tetraciclina y eritromicina (1/9). Los tres aislados fueron identificados como *U. parvum*.

En contraposición, a través del método de CMI se confirmó la susceptibilidad para los 12 aislados seleccionados como control de esta prueba, pues todos resultaron igualmente sensibles al emplear el MYCO WELL D-ONE y el método de determinación de la CMI.

Combinando los resultados de la susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislados (42) y de las muestras clínicas positivas a *Ureaplasma* spp. (220/810), recibidos en el LNR-M en el IPK entre 2013 y 2018, se demostró 1,9 % de resistencia a tetraciclina (5/262) y

1,5 % (4/262) de resistencia a eritromicina. No se encontraron aislados resistentes a levofloxacina ni a moxifloxacina (Figura 4.1).



**Figura 4.1. Resumen de la resistencia a antimicrobianos demostrada para *Ureaplasma parvum* (*U. p*) y *Ureaplasma urealyticum* (*U. u*), LNR-M, 2013 – 2018.**

#### 4.1.2. Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de aislados de *M. pneumoniae*

A través del método de microdilución en caldo para la determinación de la CMI de los antimicrobianos recomendados para el tratamiento de las infecciones por *M. pneumoniae* se demostraron cuatro aislados resistentes a macrólidos entre los 21 estudiados (19,5 %), con valores de CMI  $\geq 64$   $\mu\text{g/mL}$  para cada uno. Todos los aislados fueron sensibles para el resto de los antimicrobianos analizados.

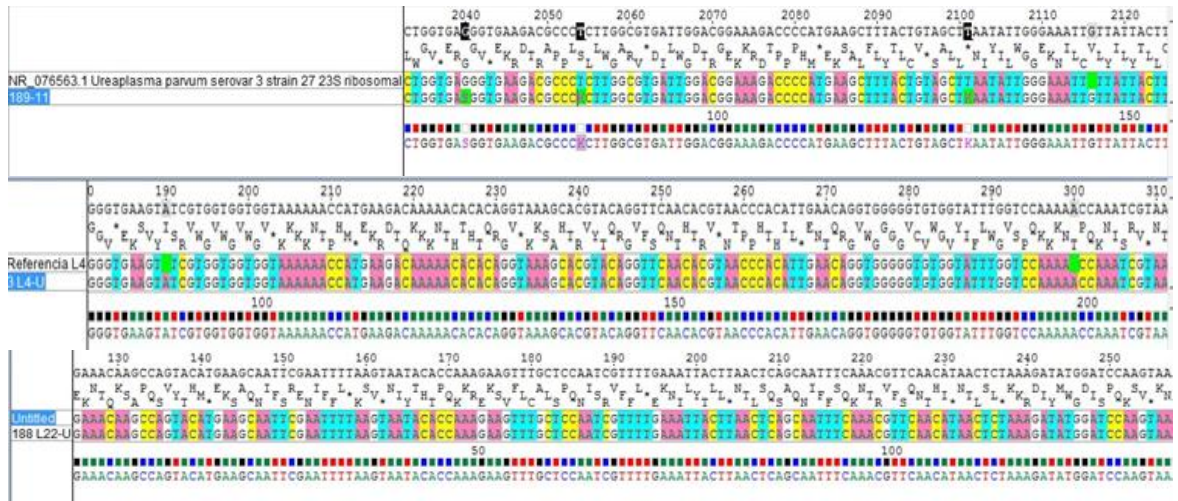
## **4.2. Demostración de los mecanismos moleculares asociados a la resistencia a tetraciclina y macrólidos en *Ureaplasma* spp. y *Mycoplasma pneumoniae*.**

### **4.2.1. Detección del gen *tet*(M) en aislados de *Ureaplasma* spp.**

Se confirmó la resistencia a tetraciclina de los cinco aislados de *U. parvum* que se revelaron resistentes por el método de microdilución en medio líquido, a través de la detección del gen *tet*(M) mediante la RT-PCR. Asimismo, se detectó dicho gen en dos de los aislados informados previamente como sensibles a través de la determinación de la CMI. No obstante, este hallazgo no modificó el informe de ambos aislados como sensibles a tetraciclina.

### **4.2.2. Detección de mutaciones específicas en *Ureaplasma* spp. que confieren resistencia a macrólidos.**

Al analizar las secuencias de los fragmentos de las regiones conservadas de las proteínas ribosomales L4 y L22 de los cuatro aislados resistentes a macrólidos confirmados por el método de microdilución en caldo, no se observaron en los fragmentos secuenciados deleciones ni cambios significativos que condujeran a sustituciones de aminoácidos. Asimismo, las secuencias de los fragmentos de la subunidad II y V del gen del ARNr 23S de los aislados no mostraron mutaciones puntuales que se asociaran con la resistencia a macrólidos (Figura 4.2).

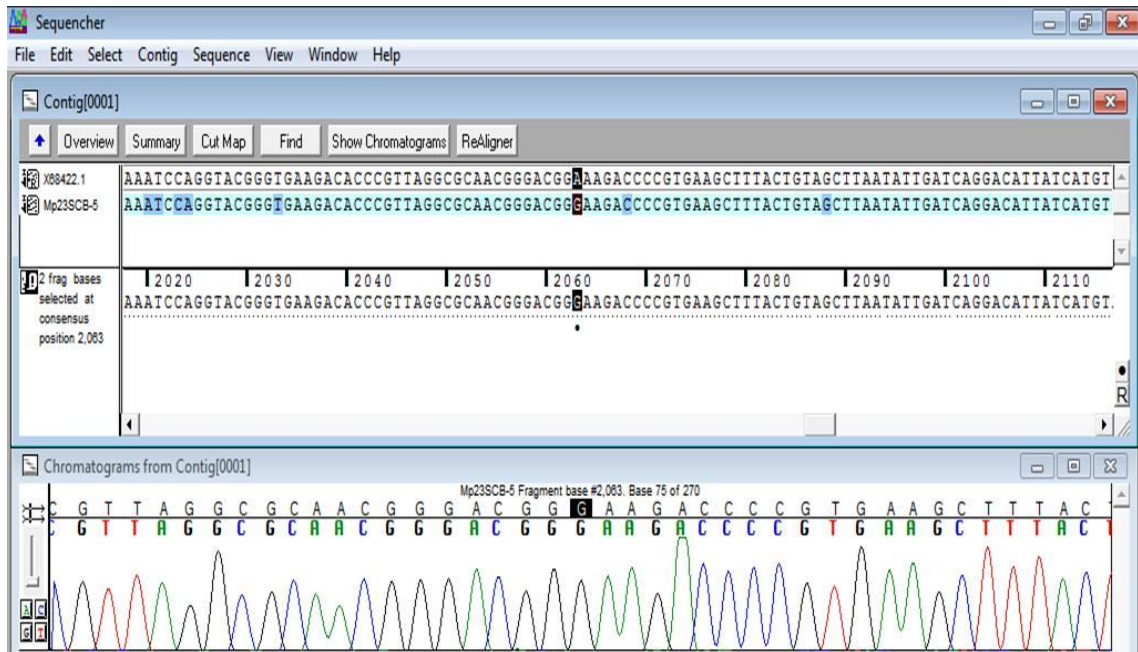


**Figura 4.2. Representación esquemática de las regiones amplificadas de los genes del ARNr 23S y las proteínas L4 y L22 de los aislados de *Ureaplasma* spp. resistentes a macrólidos.**

**4.2.3. Detección de mutaciones específicas en *M. pneumoniae* que confieren resistencia a macrólidos.**

Al analizar los fragmentos del gen del ARNr23S amplificado de los 21 aislados clínicos de *M. pneumoniae* incluidos en el estudio se confirmaron los cuatros aislados confirmados resistentes por el método de CMI. En dos de ellos se demostró la mutación A2063G y en los otros dos con la mutación A2064G. Así mismo, en las 19 muestras clínicas positivas a *M. pneumoniae* se identificaron cinco que contenían la mutación A2063G. De este modo sumaron nueve los casos en los que se detectaron mutaciones que confieren resistencia a macrólidos: siete con la mutación A2063G (77,8 %) y dos con la A2064G (22,2 %). En la figura 4.3 se muestra un ejemplo en el que se observó la mutación A2063G para uno de los aislados estudiados.





**Figura 4.3. Representación esquemática de la mutación A2063G utilizando el software Sequencher 4.10.1, en un aislado clínico de *M. pneumoniae* (2012), LNR-M, IPK.**

Combinando los resultados de la determinación del perfil de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados (año 2012) y la detección de resistencia a partir de las muestras clínicas positivas a *M. pneumoniae* (año 2017) se informó un 22,5 % (9/40) de resistencia a macrólidos (Figura 4.4).

#### **4.3. Detección de genotipos de *M. pneumoniae*.**

Los resultados primarios de las tres metodologías utilizadas para la detección de los genotipos de *M. pneumoniae* se resumen en el anexo 3.

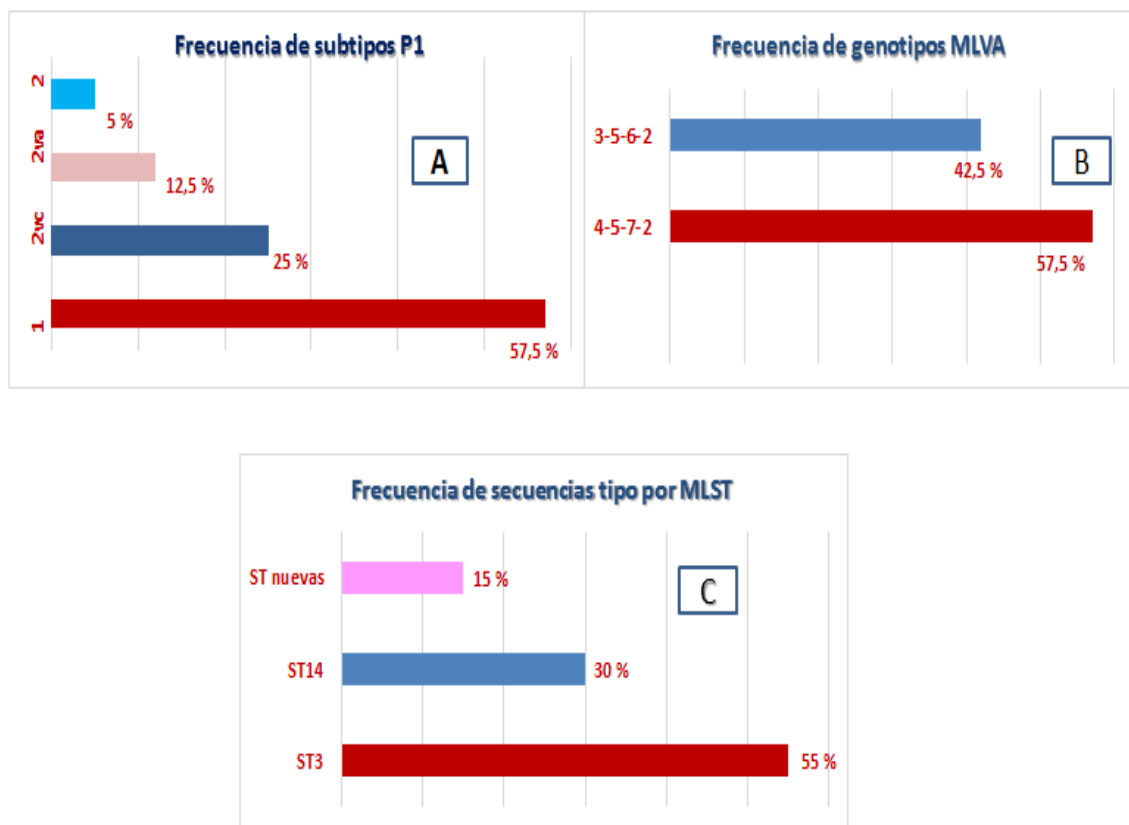
El análisis de las secuencias de los fragmentos amplificados de los elementos repetitivos repMp2/3 y repMp4 de la proteína P1 a partir de los aislados y muestras clínicas positivas a *M. pneumoniae* permitió la identificación de cuatro subtipos: 1, 2, V2a y V2c, estos últimos constituyen variantes del subtipo 2. El subtipo 1 se demostró como el más frecuente (57,5 %) (Figura 4.5, sección A). Los cuatro subtipos se observaron tanto en

aislados de *M. pneumoniae* provenientes de niños obtenidos en el 2012 como en las muestras clínicas recuperadas de adultos durante el 2017 (Anexo 3).



**Figura 4.4. Resumen del estudio de resistencia a macrólidos de *M. pneumoniae*. LNR-M, IPK, 2012 y 2017.**

Mediante el análisis de las secuencias de los fragmentos amplificados de los cuatro *locus* por MLVA se identificaron dos genotipos: el genotipo 4-5-7-2 en el 57,5 % de los casos (23/40) y el genotipo 3-5-6-2 en el 42,5 % (17/40) (Figura 4.5, sección B). El genotipo 4-5-7-2 se correspondió totalmente con el subtipo P1 y el genotipo 3-5-6-2 contuvo los subtipos P2 y sus variantes V2a y V2c. Atendiendo a ello, estos igualmente se demostraron tanto en aislados de *M. pneumoniae* provenientes de niños en el 2012 como en las muestras clínicas recuperadas de adultos durante el 2017 (Anexo 3).

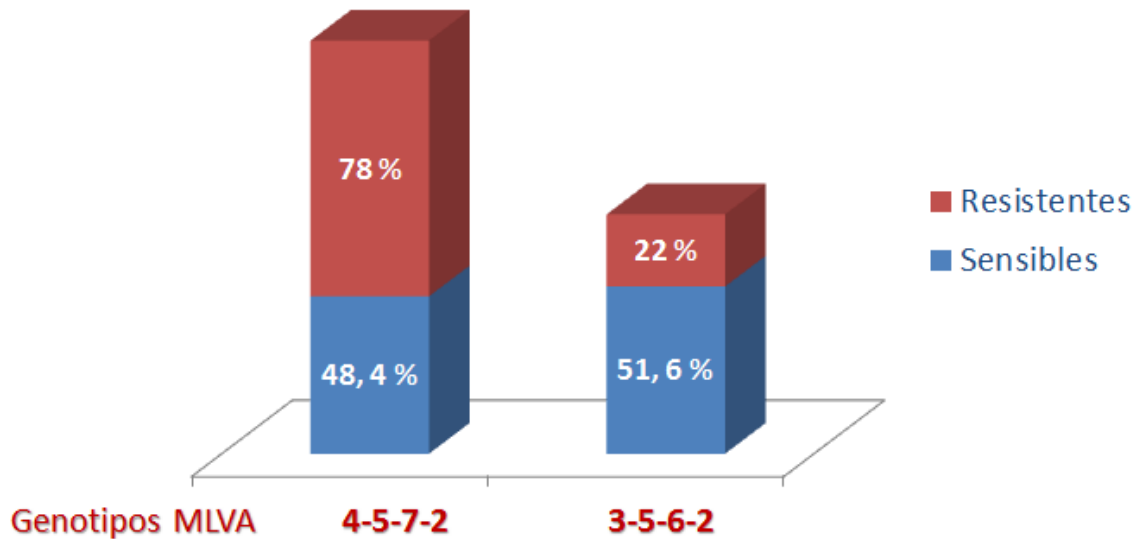


**Figura 4.5. Frecuencia de subtipos P1 (A), genotipos MLVA (B) y secuencias tipo (ST) por MLST (C) de *M. pneumoniae*, LNR-M, Cuba, 2012 y 2017.**

Al combinar los resultados de ambas metodologías de genotipificación de *M. pneumoniae* no se observó relación entre la resistencia antimicrobiana y un genotipo P1/MLVA específico (Figura 4.6).

El análisis para la detección de polimorfismos en las secuencias de los fragmentos amplificados de los ocho genes constitutivos (*ppa*, *pgm*, *gyrB*, *gmk*, *glyA*, *atpA*, *arcC* y *adk*) permitió la identificación de siete STs (Figura 4.5; sección C). La ST3 fue la más frecuente (55 %; 22/40), seguida de la ST14 (30 %; 12/40) y cinco secuencias no reportadas anteriormente; una de ellas se demostró para dos casos (línea 22 y 27, anexo 3 y el resto diferentes de esta y entre sí (líneas 8, 9, 15, 18, anexo 3). Las ST3 y ST14 se

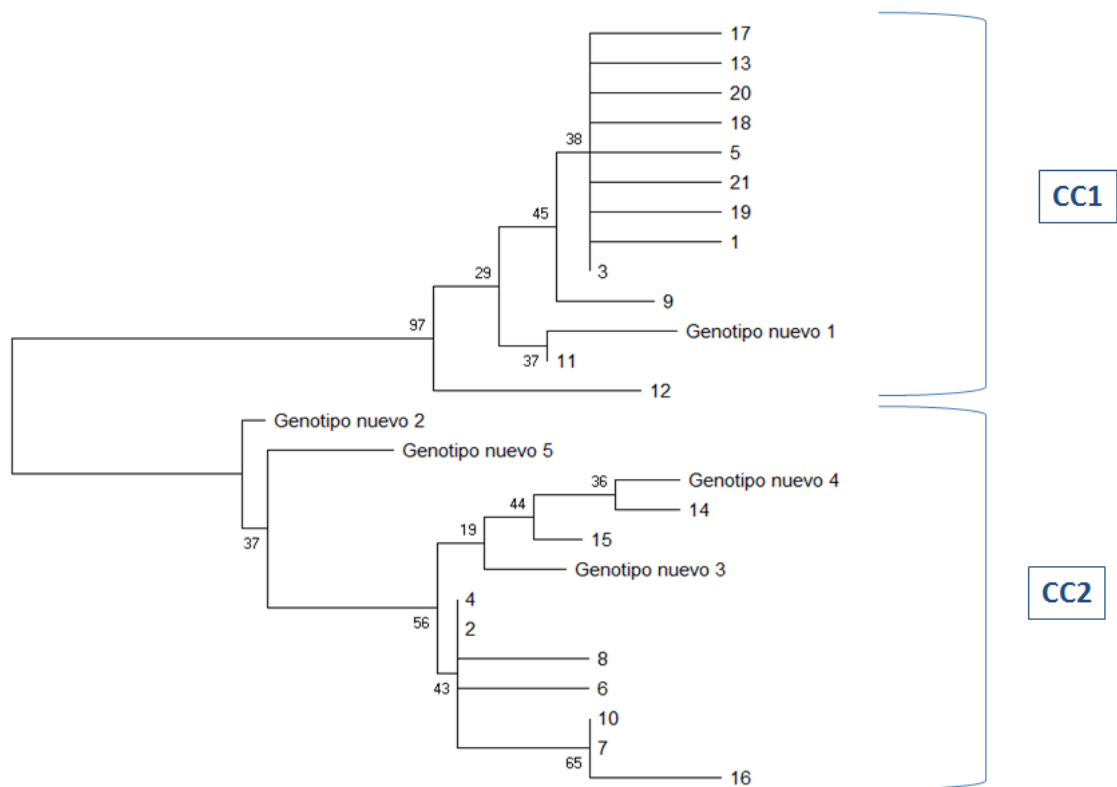
identificaron tanto en *M. pneumoniae* sensibles como resistentes a macrólidos, mientras que las ST nuevas solo se detectaron en aislados y muestras sensibles.



**Figura 4.6. Proporción de los genotipos MLVA en *M. pneumoniae* resistentes y sensibles a macrólidos, LNR-M, Cuba, 2012 y 2017.**

Los aislados y muestras clínicas que contenían la ST3 se correspondieron con el genotipo MLVA 4-5-7-2, mientras que los que contenían la ST14 se correspondieron con el genotipo MLVA 3-5-6-2. Las ST nuevas identificadas se correspondieron con aislados y muestras clínicas que contenían ambos genotipos.

Las ST identificadas en el estudio se agruparon en dos complejos clonales. El CC1 incluyó la ST3 y una ST nueva, diferente de esta en un solo alelo. El CC2 aglutinó la ST14 y el resto de las ST nuevas, dos de ellas diferentes de esta en un solo alelo y las otras dos diferentes en dos alelos (Figura 4.7).



**Figura 4.7.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud construido con el programa Mega 6 a partir de la concatenación de los *loci* *ppa*, *pgm*, *gyrB*, *gmk*, *glyA*, *atpA*, *arcC* y *adk* de aislados de *M. pneumoniae* reportados internacionalmente y de los aislados y muestras cubanas. Para la construcción del árbol se utilizó el modelo de Tamura-Nei. La escala se corresponde con el número de sustituciones por sitio.

En resumen, a través de las tres metodologías utilizadas se hizo evidente una gran variabilidad de genotipos de *M. pneumoniae* en Cuba durante el 2012 y el 2017.

## **IV. DISCUSIÓN**

## V. DISCUSIÓN

### 5.1. Susceptibilidad antimicrobiana de aislados cubanos de *Ureaplasma* spp.

Durante la última década las especies de *Ureaplasma* se reconocen como patógenos importantes del tracto urogenital y como patógenos potenciales en neonatos y pacientes inmunocomprometidos (Fernández R *et al.*, 2017; Brand MC *et al.*, 2018; Waites KB *et al.*, 2019). La asociación de *U. urealyticum* con las infecciones del tracto urogenital está bien establecida, en cambio el papel de *U. parvum* en estas infecciones todavía es controvertido, mayormente debido a que se reconoce como colonizadora del tracto urogenital en individuos sanos, particularmente en mujeres. Por otro lado, influye en este debate el hecho de que en la mayoría de los estudios no se logra la diferenciación de especies de *Ureaplasma* (De Francesco MA *et al.*, 2009; Kasprzykowska U *et al.*, 2014).

En el presente estudio la demostración en el LNR-M del IPK de *U. parvum* como la especie más frecuente entre el 2013 – 2018 se corresponde de manera general con lo descrito por otros autores. Vancutsem E y colaboradores demuestra esta especie como la predominante en estudios realizados en Bélgica (2011 y 2015) a partir de muestras clínicas provenientes de mujeres en etapas tempranas del embarazo (Vancutsem E *et al.*, 2011 y 2015). Resultados similares se informan en China en 2017 y Túnez en 2020 en estudios realizados en mujeres con infecciones urogenitales, así como en mujeres y hombres con infecciones ginecológicas e infertilidad, respectivamente (Zhang Y *et al.*, 2017; Boujemaa S *et al.*, 2020).

Por otro lado, varios estudios epidemiológicos demuestran la asociación de *U. urealyticum* con la Uretritis no gonocócica (UNG) e informan que el desarrollo de la enfermedad es dependiente de la carga bacteriana y de la respuesta de anticuerpos en los pacientes infectados (Yoshida T *et al.*, 2005; Couldwell DL *et al.*, 2010; Shimada Y *et al.*, 2014).

Esta observación se repitió en el presente estudio al constatarse que dicha especie fue la más frecuente en las muestras recuperadas de pacientes con uretritis inespecíficas. Al respecto, estudios de casos y controles evidencian que *U. parvum* no se asocia con la UNG, y un meta-análisis realizado en 2014 reconoce en cambio a *U. urealyticum* como un agente etiológico en esta infección (Deguchi T *et al.*, 2004; Wetmore CM *et al.*, 2011; Zhang N *et al.*, 2014).

De la misma forma, en el presente estudio se ratificó a *U. parvum* como la especie que predominó en las muestras de neonatos. De manera general las especies de *Ureaplasma* se asocian a las infecciones respiratorias en neonatos, y diversos estudios coinciden en notificar a *U. parvum* como la que más frecuente (Payne MS *et al.*, 2011; Sung TG *et al.* 2011, Madigan T *et al.*, 2019).

El tratamiento de las infecciones causadas por *Ureaplasma* spp. está limitado al uso de tetraciclinas, macrólidos y fluoroquinolonas. La resistencia a estos grupos de antimicrobianos se documenta para aislados clínicos de *Ureaplasma* en diferentes regiones del planeta y se considera una resistencia adquirida fundamentalmente como consecuencia de mutaciones cromosomales (Waites KB *et al.*, 1993; Beeton ML *et al.*, 2009a). Las opciones terapéuticas restringidas para combatir las infecciones causadas por ureaplasmas justifican entonces la importancia de estudiar su incidencia y la prevalencia de los mecanismos implicados (Meygret A *et al.*, 2018).

La presente investigación constituye el primer acercamiento a esta problemática en Cuba, a partir de los resultados del estudio de aislados recuperados de las muestras recibidas en el LNR-M (2013 - 2018), utilizando métodos convencionales y moleculares. Los estudios precedentes en el país notifican porcentajes elevados de resistencia antimicrobiana en muestras informadas como positivas para *Ureaplasma* spp., pero en ellos solo se emplean sistemas diagnóstico comerciales y no se realiza la confirmación mediante métodos de



referencia ni moleculares (Díaz L *et al.*, 2013; Rodríguez N *et al.*, 2014; Ramírez Y *et al.*, 2018). La baja frecuencia de resistencia a tetraciclina (1,9 %) y eritromicina (1,5 %) puesta de manifiesto en este estudio, y el 100 % de susceptibilidad a levofloxacin y moxifloxacin, se contraponen con estas observaciones previas.

La frecuencia de resistencia para la tetraciclina coincide con la reportada por dos estudios realizados en Estados Unidos: 1,4 % de aislados resistentes a tetraciclina recuperados de muestras de orina de jóvenes universitarias y 0,4 % a partir del estudio de otras muestras clínicas provenientes de neonatos y adultos (orina, vagina, cérvix, aspirado traqueal, esputo, entre otras) (Fernández J *et al.*, 2016; Valentine-King M *et al.*, 2017). También se asemeja a la comunicada por una investigación que incluye muestras de Inglaterra y Gales obtenidas de mujeres y neonatos (2,3 %) (Beeton ML *et al.*, 2016). En cambio, más recientemente en Francia se demuestra una frecuencia de resistencia mayor a tetraciclina (7,5 %) al estudiar un número amplio de diferentes tipos de muestras clínicas y de diversos grupos de pacientes, pero dentro de las cuales algunas son de origen desconocido (Meygret A *et al.*, 2018). Otro estudio realizado en Túnez refiere un 25 % de resistencia a tetraciclina, pero este se limita a analizar aislados recuperados de pacientes con infecciones ginecológicas e infertilidad (Boujemaa S *et al.*, 2020). Esta variación global en la tasa de resistencia a tetraciclina podría obedecer a las diferencias en las prácticas clínicas y políticas de tratamiento en cada país o región.

La comparación de la frecuencia de resistencia a la eritromicina demostrada en este estudio con la que se publica a nivel internacional, permite constatar que es similar a la encontrada en Estados Unidos (1 %) e Inglaterra (1,6 %) al analizar muestras clínicas de diferentes grupos de pacientes y de neonatos con ventilación mecánica, respectivamente (Xiao L *et al.*, 2011; Beeton ML *et al.*, 2009a). Incluso, otros trabajos revisados concuerdan en no detectar aislados resistentes a eritromicina (Beeton ML *et al.*, 2016;

Valentine-King M *et al.*, 2017; Meygret A *et al.*, 2018). En cambio, aunque esta resistencia es infrecuente, un estudio realizado en Sudáfrica alerta sobre un 26,7 % de aislados resistentes a eritromicina recuperados de muestras clínicas de embarazadas, y al respecto comenta que esto podría obedecer a que este es uno de los antibióticos ampliamente utilizado en el país para el manejo sintomático de las ITS (Govender S *et al.*, 2012).

Al respecto de las diferencias en los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de las dos especies de *Ureaplasma* de importancia médica no se registran datos publicados; los escasos estudios disponibles se centran en comparar las CMI obtenidas. Por ejemplo, Beeton y colaboradores encuentran que para *U. urealyticum* la media de la CMI de todos los antibióticos estudiados, excepto el cloranfenicol y la azitromicina, fue significativamente mayor que para *U. parvum* y apuntan que tratándose de dos especies diferentes este no constituye un hallazgo sorprendente (Beeton ML *et al.*, 2016). Sin embargo, nuevamente en un estudio realizado en Estados Unidos también se observó que la media de la CMI para todos los antibióticos analizados, excepto doxiciclina, fue significativamente mayor para *U. urealyticum* y en contraposición, los dos únicos aislados en los que se demostraron determinantes de resistencia conocidos fueron identificados como *U. parvum* (Valentine-King M *et al.*, 2017). Asimismo, aunque no concluyen diferencias en las proporciones de resistencia por especie, los valores de CMI para fluoroquinolonas fueron una dilución mayor igualmente para *U. urealyticum* que para *U. parvum* (Fernández J *et al.*, 2016).

Para las fluoroquinolonas se impone comentar que el 100 % de susceptibilidad que se informó en el presente estudio discrepa con los resultados que comunican la mayoría de los estudios a nivel global, ya sea utilizando métodos presuntivos o los de referencia. Por ejemplo: un estudio realizado en China en 2015, en mujeres con infección urogenital

reporta 76,9 % y 23,1 % de resistencia a levofloxacin y moxifloxacin, respectivamente (Song J *et al.*, 2015); mientras en Jap3n, un estudio realizado ese mismo a3o informa un 57 % de resistencia a levofloxacin (Kawai Y *et al.*, 2015). Por otro lado, porcentos menores de resistencia a levofloxacin y moxifloxacin (1,2 % y 0,1 %, respectivamente), se comunican en un estudio realizado en Francia en 2018 en aislados recuperados de grupos diversos de pacientes (Meygret A *et al.*, 2018).

Los resultados del presente estudio podr3an justificarse por el hecho de que en Cuba no se utilizan estas fluoroquinolonas; el uso de la levofloxacin se restringe al nivel hospitalario y la moxifloxacin no se introdujo a3n en el cuadro b3sico de medicamentos (Direcci3n de medicamentos y tecnolog3as m3dicas del Minsap, 2018). Se necesitan, adem3s de las cl3sicas mutaciones de resistencia a las quinolonas, otras menos frecuentes que se producen en la misma medida en que m3s se usa el antimicrobiano (Gruson D *et al.*, 2005). Asimismo, otros autores tambi3n teorizan acerca de que las diferencias regionales en la susceptibilidad a fluoroquinolonas puede ser el resultado de variaciones en las pol3ticas de uso de estos antibi3ticos (Song J *et al.*, 2015).

Existe una gran variedad en las proporciones de aislados resistentes informadas en las diferentes regiones del mundo e incluso dentro de un mismo pa3s. Esta se asocia a la diversidad de m3todos empleados para su detecci3n y en este sentido se destaca el amplio uso que hacen los laboratorios a nivel internacional de diferentes estuches comerciales, que no siempre conducen a resultados confiables y validados contra los m3todos convencionales (Beeton ML y Spiller OB, 2016).

La sobrestimaci3n de la resistencia antimicrobiana empleando los estuches comerciales disponibles a nivel internacional para el estudio de la susceptibilidad de aislados de *Ureaplasma* spp. se corrobor3 en el presente estudio, pues el informe de resistencia para 71 de las muestras empleando el sistema MYCO WELL D-ONE se redujo a solo tres

aislados cuando estos se estudiaron por el método de la CMI. ¿A qué obedece esta divergencia entre ambos métodos y qué solo se observara concordancia en los resultados obtenidos para la tetraciclina en tres aislados y en uno de ellos además para la eritromicina?

De manera general varios estudios coinciden en reconocer como una limitante de los estuches comerciales el hecho de que estos utilizan concentraciones de antibióticos por debajo de las establecidas por el CLSI para definir la resistencia verdadera. Schneider SC y colaboradores encontraron resultados contradictorios entre el sistema de diagnóstico Mycoplasma IST2 y la microdilución en caldo para la detección de resistencia a ciprofloxacina y azitromicina, pues la mayoría de los aislados reportados como resistentes no fueron confirmados (Schneider SC *et al.*, 2015). También, Beeton ML y colaboradores, así como Piccinelli G y colaboradores demostraron que Mycoplasma IST2 sobreestima la resistencia a ciprofloxacina y fluoroquinolonas, respectivamente. Para este se reconocen dos limitaciones importantes que conducen a dicho resultado; por un lado, incluye a la ciprofloxacina como antimicrobiano para predecir la resistencia a las fluoroquinolonas, y por otro, define como valor de corte 2 mg/L. La ciprofloxacina es menos efectiva que la levofloxacina, que es la recomendada por el CLSI para informar la resistencia a esta familia de antibióticos, para la cual se establece 4 mg/L como valor de corte (Beeton ML *et al.*, 2016; Piccinelli G *et al.*, 2017).

Meygret A y colaboradores en 2018 al comparar el estuche comercial MYCOFAST RevolutionN con el método de determinación de la CMI, también demuestran la sobreestimación de la resistencia que resulta del empleo de estos sistemas. Estos autores observaron divergencias para fluoroquinolonas y tetraciclina. Sin embargo, en el MYCOFAST RevolutionN se utilizan los puntos de corte regulados por el CLSI para *Ureaplasma* (Meygret A *et al.*, 2018).

Tanto en el Mycoplasma IST2 y el MYCOFAST RevolutioN el informe que se hace de la susceptibilidad a los antimicrobianos incluidos en el sistema no permite delimitar la resistencia para *Ureaplasma* spp. y *M. hominis* en muestras donde exista coinfección, pues la galería de las diferentes concentraciones de los antibióticos es la misma para ambos. Esta podría ser una de las causas del reporte incorrecto de resistencia antimicrobiana empleando ambos sistemas, dado que *M. hominis* es resistente intrínsecamente a los macrólidos y la probabilidad de las infecciones mixtas es muy amplia, entre 5 y 60 % de las muestras dependiendo del grupo examinado (Clegg A *et al.*, 1997; Redelinghuys MJ *et al.*, 2014; Zeng XY *et al.*, 2016). En cambio, en el MYCO WELL D-ONE, donde sí se toman como referencia los puntos de corte del CLSI, la susceptibilidad a los antimicrobianos en las muestras positivas a *Ureaplasma* spp. y *M. hominis* se examina e informa por separado.

La causa por la que el MYCO WELL D-ONE sobrestima en el presente estudio la resistencia a los antimicrobianos, especialmente para tetraciclina, parece ser otra que es también imputable a los sistemas anteriores. En ninguno de ellos se utiliza un método de dilución para cuantificar adecuadamente la concentración del inóculo que se adiciona en los pocillos. Al respecto, las normas del CLSI establecen que una concentración mayor de  $10^5$  UFC/mL conducirá a un resultado falso resistente. Como en estos sistemas la lectura se fundamenta en el cambio de color de los pocillos como consecuencia de la variación del pH en el medio, un inóculo muy concentrado podría falsear el resultado. Esto ocurre incluso cuando la síntesis de proteína está completamente inhibida por la acción del antibiótico, como consecuencia de una mayor concentración de la ureasa propia de la bacteria aunque esta no esté replicándose (Smith, D.G *et al.*, 1993; Beeton ML y Spiller OB, 2016).

Recientemente, Morris D y colaboradores al comparar el MYCO WELL D con el método de referencia para la detección de la susceptibilidad a los antimicrobianos demuestran también sobreestimación de la resistencia y la adjudican a las limitaciones de este sistema en relación a la no estandarización del inóculo (Morris D *et al.*, 2020).

Es indiscutible que los sistemas comerciales para el diagnóstico de las infecciones por micoplasmas y ureaplasmas, y para informar presuntivamente la susceptibilidad a los antimicrobianos, podrían ser útiles en la pesquisa de poblaciones grandes o en condiciones donde el soporte de laboratorio es pobre. Sin embargo, sus resultados siempre deberán confirmarse a través de los métodos convencionales o moleculares (Beeton ML y Spiller OB, 2016).

Adicionalmente, ante los aislados en los que se demostró la resistencia tanto por los métodos convencionales como empleando los estuches comerciales, el resultado deberá complementarse con la detección de los mecanismos de resistencia implicados. En correspondencia, tal y como se esperaba, para los cinco aislados resistentes a tetraciclina en el presente estudio se corroboró la presencia del gen *tet(M)*. La resistencia a tetraciclina en *Ureaplasma* se reconoce que está mediada por dicho gen, que confiere protección ribosomal, bloqueando la unión del antibiótico a la subunidad 30S (Chopra y Roberts, 2001; Beeton ML *et al.*, 2016).

El hecho que se detectara el gen *tet(M)* también en dos aislados sensibles a tetraciclina se corresponde con lo documentado por otros estudios (Beeton ML *et al.*, 2009a; Kotrotsiou T *et al.*, 2015; Beeton ML *et al.*, 2016; Fernández J *et al.*, 2016). Esto obedece a algunas variantes del gen *tet(M)* que pueden rendir fenotipos de resistencia inducible en presencia de bajos niveles de tetraciclina. Atendiendo a ello, cuando se examina la resistencia a tetraciclina puede ser necesario el análisis tanto por microdilución en caldo para determinar la susceptibilidad fenotípica, como a través de la detección del gen *tet(M)*

(Beeton ML *et al.* 2016). Su detección en aislados susceptibles fenotípicamente no modifica tal informe, no obstante, en opinión de la autora del presente estudio es una información que el laboratorio debe proporcionar al médico tratante, pues el uso de la tetraciclina podría conducir a la inducción subsecuente de la resistencia durante el tratamiento, tal y como se observó en el laboratorio tras la exposición a diferentes concentraciones de tetraciclina (Beeton ML *et al.*, 2016).

En relación a los mecanismos moleculares implicados en la resistencia a eritromicina en *Ureaplasma* spp., las sustituciones de aminoácidos en las proteínas ribosomales L4 y L22 son las más frecuentemente descritas a nivel internacional. Las mutaciones en una o ambas copias del ARNr 23S en el genoma, también se asocian a resistencia a macrólidos, variando las proporciones descritas en dependencia de la región geográfica (Pereyre S *et al.*, 2007; Dongya M *et al.*, 2008; Beeton ML *et al.*, 2009a). Sin embargo, en el presente estudio los aislados resistentes a eritromicina no contenían ninguna de estas mutaciones, lo que está en correspondencia con los valores bajos de CMI demostrados para ellos (CMI entre 16 y 64 µg/mL). La mayoría de los aislados de *Ureaplasma* que portan uno de los mecanismos cromosomales de resistencia anteriormente mencionados tienen valores de CMI  $\geq 128$  µg/mL para eritromicina (Schneider SC *et al.*, 2015). Cabría esperar entonces que la resistencia en estos aislados obedezca a mutaciones en otras regiones de estos mismos genes no investigadas en el presente estudio, pero que se demuestran recientemente en aislados de *Ureaplasma* spp. resistentes a macrólidos por otros autores (Yang T *et al.*, 2020). Estos autores amplificaron una región del ARNr 23S más extensa, lo que les permitió demostrar mutaciones en el sitio 2654, además de las descritas hasta ese momento como las más frecuentes.

Otro mecanismo también descrito como asociado a la resistencia a macrólidos en bacterias es la modificación ribosomal por metilación, a través de la adquisición del gen *erm*,

usualmente transportado por elementos móviles (Seral C *et al.*, 2001). Esto, junto a la expresión de proteínas bacterianas que modifiquen los macrólidos y el aumento del eflujo del antibiótico a través de canales de iones (Beeton ML *et al.*, 2009a), pudieran evocarse como los mecanismos responsables por el aumento de la tolerancia a eritromicina en los aislados de *Ureaplasma* spp. del presente estudio. Por ejemplo, en China se demuestra el gen *ermB* (subtipo del gen *erm*) en aislados clínicos de *U. urealyticum* resistentes a eritromicina obtenidos de la uretra o cérvix de pacientes con UNG o cervicitis mucopurulenta, y se describe la presencia de cuatro subtipos del gen *msr*, que es uno de los genes más comunes de eflujo activo (Lu Ch *et al.*, 2010). Más recientemente, también en China se reitera el hallazgo del gen *ermB* a partir del estudio de 19 aislados de *Ureaplasma* spp. resistentes a eritromicina (Yang T *et al.*, 2020). Ninguno de estos genes (*erm* y *msr*) se buscó en los aislados resistentes a macrólidos en el presente estudio.

Los bajos niveles de resistencia antimicrobiana demostrados para aislados cubanos de *Ureaplasma* spp. en el período 2013 - 2018 no descartan la necesidad de mantener una vigilancia activa sobre este fenómeno. Al respecto son divergentes los criterios a nivel internacional, pues se cuestionan las evidencias disponibles para considerar estas especies como agentes etiológicos de ITS, y no existen datos que demuestren con robustez que el tratamiento antimicrobiano las erradique (Horner P *et al.*, 2018). Sin embargo, no debe perderse de vista que la transmisión sexual constituye la vía primaria para la diseminación en adultos de las infecciones por *Ureaplasma* spp. y otras especies de micoplasmas, y que esto al mismo tiempo podría contribuir de manera casi inadvertida a la propagación de la resistencia a tetraciclina y otros antibióticos, incluso en los neonatos. Los cambios en los patrones de resistencia antimicrobiana que se producirían como consecuencia de ello impondría la necesidad de modificar las estrategias de tratamientos, pero esto solo puede



ser demostrado a través de la vigilancia sistemática de la susceptibilidad a los antimicrobianos de elección que actualmente se recomiendan.

## **5.2. Susceptibilidad antimicrobiana de aislados cubanos de *M. pneumoniae*.**

*M. pneumoniae*, responsable de infecciones del tracto respiratorio alto y bajo, puede causar entre un 20 y 40 % de las neumonías bacterianas adquiridas en la comunidad durante fases epidémicas, y los niños en edad escolar y adolescentes resultan el grupo etario más afectado (Waites KB *et al.*, 2017). El tratamiento de estas infecciones, al igual que para *Ureaplasma* spp., está limitado al uso de tetraciclinas, fluoroquinolonas y macrólidos, siendo estos últimos el tratamiento de elección principalmente en niños en los que el uso de las tetraciclinas y fluoroquinolonas pueden producir efectos adversos. Sin embargo, su uso inapropiado o exagerado conduce a la emergencia de aislados clínicos resistentes a macrólidos en diferentes países, llegando a alcanzar hasta un 90 % en China y Japón (Cao B, 2015). La resistencia a este grupo de antimicrobianos está determinada por mutaciones puntuales en el dominio V de la subunidad 23S del ARNr, lo que reduce la afinidad del antibiótico al ribosoma, y ocasionalmente también involucra mutaciones en las proteínas ribosomales L4 y L22. En contraste, hasta el momento no se documenta resistencia a las fluoroquinolonas o las tetraciclinas en aislados clínicos de *M. pneumoniae* (Pereyre S *et al.*, 2016; Zhao F *et al.*, 2019).

Este escenario a nivel mundial, así como el conocimiento prácticamente nulo de dicha problemática en Cuba justificó la importancia de su estudio, por lo que esta investigación constituye un primer acercamiento al tema. A partir del análisis de los resultados obtenidos en el LNR-M de la susceptibilidad de aislados clínicos y muestras positivas a *M. pneumoniae*, utilizando métodos de referencia y moleculares, es posible inferir que se mantienen la sensibilidad a tetraciclina, levofloxacin y moxifloxacin (100 % de aislados

susceptibles), mientras que para los macrólidos se advierte la emergencia de resistencia (22,5 %).

Teniendo en cuenta el lento crecimiento de *M. pneumoniae* y la consiguiente complejidad para la obtención de aislados a partir de las muestras clínicas positivas, la mayoría de los estudios realizados a nivel internacional describen la prevalencia de resistencia a macrólidos mediante el empleo de métodos moleculares aplicados directamente a las muestras clínicas. En total correspondencia con lo anterior, en el presente estudio los resultados observados para los 21 aislados recuperados durante el 2012 se complementaron con los del análisis de 19 muestras que resultaron positivas a *M. pneumoniae* durante el 2017.

De este modo, la frecuencia de resistencia a macrólidos demostrada (22,5 %) coincide con la reportada por un estudio realizado en Italia en 2019, donde el 20 % de las muestras positivas a *M. pneumoniae* mostraron resistencia a macrólidos, pero se impone comentar que todas procedían de pacientes adultos con neumonía adquirida en la comunidad, independientemente de que requirieran hospitalización o no (Loconsole D *et al.*, 2019). En cambio, en el presente estudio además de las muestras provenientes de adultos con infección respiratoria aguda, se incluyeron los resultados del estudio de aislados resistentes recuperados de niños con neumonía intersticial. Otro estudio realizado en Corea refiere un valor de resistencia de macrólidos similar (17,6 %), pero este incluye solo muestras positivas a *M. pneumoniae* recuperadas de pacientes pediátricos con infección respiratoria (Uh Y *et al.*, 2013).

Poco se conoce sobre la situación de la resistencia en *M. pneumoniae* en América del Sur y el Caribe; solo existe el antecedente de un estudio realizado en Colombia en 2018 en niños hospitalizados con neumonía adquirida en la comunidad, en el que no se demostró resistencia a macrólidos (Copete AR *et al.*, 2018). Por otro lado, cifras menores a las de la

presente investigación (22,5 %) otros dos estudios realizados en Estados Unidos. El primero de ellos informa un 13,2 % de resistencia a macrólidos a partir de muestras obtenidas de pacientes entre 10 meses y 66 años de edad, con infecciones respiratorias variadas causadas por *M. pneumoniae* (Zheng X *et al.*, 2015). El segundo, en el que se analizan los resultados de ocho años de vigilancia, notifica un 10 % de resistencia a partir del estudio de diversas muestras clínicas obtenidas de pacientes con infección respiratoria, desde 4 meses hasta 72 años de edad (Diaz MH *et al.*, 2015b). De manera similar en Canadá se informa un 12,1 % de resistencia a macrólidos, al estudiar muestras provenientes de niños y adultos con infecciones respiratorias debidas a *M. pneumoniae* (Eshaghi A *et al.*, 2013).

Igualmente, son bajos los porcentajes de resistencia que de forma general se informan en países europeos: 0,8 % en Eslovenia, 1,6 % en Dinamarca, 3,6 % en Alemania y 0,2 % en Suecia (Kogoj R *et al.*, 2018; Uldum SA *et al.*, 2012; Dumke R *et al.*, 2013; Gullsby R *et al.*, 2019). En contraste, en los países asiáticos se advierten los porcentajes de resistencia a macrólidos más elevados: 94,8 % y 88,3 % en China, 87,2 % y 81,6 % en Corea y Japón, respectivamente (Sun H *et al.*, 2017; Qu J *et al.*, 2019; Lee E *et al.*, 2017; Tanaka T *et al.*, 2017).

En resumen, es evidente una gran divergencia en la prevalencia de resistencia a macrólidos en *M. pneumoniae* a nivel internacional, y esto podría ser consecuencia de las diferencias regionales al respecto del uso de este antimicrobiano.

La demostración en el presente estudio de la mutación A2063G como la más frecuente (77,8 %) detectada en el dominio V del gen del ARNr 23S, coincide con lo observado en varios estudios realizados en China y Japón (Zhao H *et al.*, 2014; Tanaka T *et al.*, 2017; Zhao F *et al.*, 2019; Qu J *et al.*, 2019); asimismo con lo referido en estudios realizados en Canadá y Estados Unidos (Eshaghi A *et al.*, 2013; Waites KB *et al.*, 2019).

*M. pneumoniae* se considera una especie altamente conservada genéticamente, ya que las comparaciones genómicas revelan más de un 99 % de similitud en las secuencias de nucleótidos de diferentes aislados (Lluch-Senar M *et al.*, 2015; Xiao L *et al.*, 2015). No obstante, varios métodos basados en variaciones en elementos genéticos se han desarrollado para su caracterización con fines epidemiológicos (Waites KB *et al.*, 2017). En este sentido sobresalen los métodos que se fundamentan en la caracterización de la proteína P1, el análisis de diferentes locus a través del MLVA y de ocho genes constitutivos mediante el MLST.

Las variaciones en la secuencia del gen de la proteína de adhesión P1, mayor determinante de virulencia de *M. pneumoniae* que facilita su adherencia a las células del epitelio respiratorio durante la infección, se espera que resulten en alteraciones en la superficie de exposición de la proteína y por tanto afecten potencialmente el proceso de infección (Kogoj R *et al.*, 2015). En el presente estudio la genotipificación con base en la secuencia del gen de la proteína P1 demostró diversidad de subtipos en los aislados y muestras clínicas positivas a *M. pneumoniae* analizadas, pues se identificaron cuatro subtipos diferentes (1, 2, V2a y V2c), dentro de los cuales el subtipo 1 resultó el más frecuente (57,5 %). Este resultado coincide con lo reportado por dos estudios realizados en China en pacientes pediátricos y adultos mayores con infecciones respiratorias (Zhao F *et al.*, 2019; Qu J *et al.*, 2019). También en Eslovenia el subtipo 1 se informa como el más frecuente a partir del estudio de muestras de pacientes con diversas infecciones del tracto respiratorio alto y bajo (Kogoj R *et al.*, 2018). De igual forma en Estados Unidos se obtuvo el mismo subtipo tras el análisis de un amplio número de aislados y muestras clínicas de pacientes con diferentes infecciones respiratorias durante ocho años de estudio (Díaz MH *et al.*, 2015).

En contraste, los dos únicos estudios precedentes realizados en la región de Latinoamérica coinciden en demostrar el subtipo 2 como el más frecuente. El primero de ellos, conducido en Chile, notifica un 78,3 % del subtipo 2 al estudiar 23 muestras recuperadas entre el 2005 – 2006, a partir de adultos con neumonía adquirida en la comunidad (Martínez MA *et al.*, 2010). El otro estudio, realizado en Medellín, Colombia, entre el 2012 - 2013, informa este mismo subtipo en el 96,1 % de las muestras de esputo y en el 89,3 % de las muestras de exudado nasofaríngeo de 73 niños con diagnóstico de neumonía adquirida en la comunidad (Copete AR *et al.*, 2018). Las diferencias entre los resultados de ambos estudios con las observaciones en Cuba, podría obedecer a que estos autores solo analizan uno de los elementos repetitivos que se considera determinan la diversidad genética con base en el análisis de la proteína P1.

Por otra parte, la genotipificación de *M. pneumoniae* empleando la MLVA permitió la detección de dos genotipos diferentes (4-5-7-2 y 3-5-6-2). Esta metodología, que se fundamenta en el análisis de cuatro locus específicos (Mpn13, Mpn14, Mpn15 y Mpn16), luego de su estandarización en el 2015 es actualmente la más utilizada (Chalker VJ *et al.*, 2015). Con su empleo, durante los últimos 10 años se demuestran los genotipos 4-5-7-2, 3-5-6-2 y 3-6-6-2 como los más comunes en América del Norte, Asia y Europa (Sun H *et al.*, 2013; Yan C *et al.*, 2015; Kenri T *et al.*, 2018; Gullsby R *et al.*, 2019).

También se demuestra una correlación entre los genotipos MLVA y los demostrados para P1 (Benitez AJ *et al.*, 2012; Waller JL *et al.*, 2014; Diaz MH *et al.*, 2015; Sun H *et al.*, 2017; Zhao F *et al.*, 2019). De manera general los aislados con el genotipo 4-5-7-2 coinciden con el subtipo 1, mientras que los genotipos 3-5-6-2 y 3-6-6-2 coinciden con el subtipo 2, tal y como se observó en el presente estudio; sin embargo, no existen elementos suficientes que permitan explicar este fenómeno. Las razones biológicas que expliquen esta correlación no se conocen; los locus que se estudian por MLVA se localizan en

regiones diferentes del genoma e incluso una de ellas está en una región intergénica (Degrange S *et al.*, 2009; Zhao F *et al.*, 2019; Loconsole D *et al.*, 2019; Xiao L *et al.*, 2020).

Justamente, atendiendo a esta correspondencia absoluta entre el genotipo 4-5-7-2 y el subtipo 1, la autora de este estudio no estimó oportuno la comparación de las frecuencias de los genotipos MLVA con las informadas por otras investigaciones. Además, porque se trató también de los genotipos más frecuentes entre los aislados y muestras estudiadas. En cambio, sí se impone comentar que contrariamente a lo esperado, un hallazgo interesante lo constituyó la demostración de una diversidad genética mayor a través de la genotipificación, basada en la proteína de adhesión P1 que por MLVA, que como ya se refirió anteriormente permite mayor discriminación (Degrange S *et al.*, 2009). Para encontrar explicación a esta observación es necesario ampliar la genotipificación a un número mayor de aislados y muestras clínicas, y considerar en ese momento todos los datos clínicos, epidemiológicos y demográficos que se reconocen pudieran influir en los resultados.

Los intentos por demostrar una asociación entre genotipos específicos de *M. pneumoniae* y resistencia a macrólidos no arriban a conclusiones definitivas, en lo que influye indudablemente la diferencia en la frecuencia de esta resistencia en los países en los que se han conducido los estudios. Por ejemplo, en Estados Unidos y Europa, donde la incidencia de resistencia a macrólidos es  $\leq 10\%$  y donde el subtipo 1 de la proteína P1 y MLVA 4-5-7-2 fueron más comunes, no se ha encontrado asociación y se detectan otros genotipos también responsables de este fenómeno (Díaz MH *et al.*, 2015, 2015a; Kogoj R *et al.*, 2015). Mientras tanto, en China y Taiwán, países con mayor incidencia de resistencia a

macrólidos, sí se confirma una asociación de la resistencia con el genotipo MLVA 4-5-7-2 (Ho PL *et al.*, 2015; Sun H *et al.*, 2017, Qu J *et al.*, 2019; Lu CY *et al.*, 2019).

En resumen, en el presente estudio se demuestra una correspondencia entre los subtipos P1 y MLVA, pero no se percibe una relación entre la resistencia antimicrobiana y un genotipo P1/MLVA específico. Tampoco es posible informar una clara dominancia de uno u otro genotipo en los dos momentos en los que se obtuvieron las muestras o aislados analizados; en ambos años de estudio (2012 y 2017) circularon los dos genotipos (Anexo 3) y se demostró resistencia a macrólidos indistintamente.

De manera añadida, el empleo del MLST para la genotipificación, permitió en esta investigación poner en evidencia una mayor diversidad de la que se demostró con P1 y el MLVA. Esta herramienta propuesta por Brown RJ y colaboradores en 2015 se basa en el polimorfismo de ocho genes constitutivos, resulta más discriminatoria y permite la clasificación de *M. pneumoniae* en dos grupos genéticamente diferentes atendiendo a las ST. Para estos complejos clónales (CC1 y CC2) se describe correspondencia con los genotipos MLVA: CC1 que incluye las secuencias tipo que contiene el genotipo MLVA 4-5-7-2, mientras que el CC2 incluye las secuencias tipo que contienen los genotipos MLVA 3-6-6-2 y 3-5-6-2 (Brown RJ *et al.*, 2015). No obstante, este método se utiliza poco pues aunque también se aplica directamente a muestras clínicas, tiene como desventaja la necesidad de realizar varias reacciones de secuenciación, lo que es laborioso y caro.

La demostración en el presente estudio de la ST3 como la más frecuente coincide con lo reportado por dos estudios publicados al respecto. Este es el caso de uno en Corea y otro en Japón, en los que se identifica la ST3 como la más frecuente, la ST14 en segundo lugar y otras ST en menor proporción, y se destaca la relación entre el subtipo 1 de la proteína P1 y el CC1, así como entre el subtipo 2 y sus variantes de la proteína P1 y el CC2 (Lee

JK *et al.*, 2018; Ando M *et al.*, 2018). En estos estudios la ST14 se reconoce asociada al CC2, que no fue identificada en el momento en que Brown RJ y colaboradores en el 2015 publican sus resultados (Brown RJ *et al.*, 2015). En cambio, Morozumi M y colaboradores en un estudio realizado también en Japón pero más recientemente (2018 y 2019), describen la ST17 y la ST33 como las más frecuentes, y demuestran también una disminución de la resistencia a macrólidos en ese momento (Morozumi M *et al.*, 2020).

En el presente estudio se corroboró al mismo tiempo la correlación entre las ST que correspondían al genotipo MLVA 4-5-7-2 y el CC1, y entre las ST que correspondían al genotipo MLVA 3-5-6-2 y el CC2.

No obstante a que la técnica de MLST es cara y laboriosa como se comentó anteriormente, se constató en esta investigación su gran valor como herramienta de genotipificación de *M. pneumoniae*, pues permite realizar un análisis más detallado y de gran utilidad especialmente ante brotes durante los picos epidémicos.

### **5.3. Discusión general**

Atendiendo a los resultados de esta investigación se ratifica parcialmente la hipótesis predictiva planteada al inicio. La resistencia a los antimicrobianos recomendados para el tratamiento de las infecciones por *Ureaplasma* spp. si bien debe constituir un fenómeno sobre el que se mantenga una vigilancia sistemática en Cuba, en el momento actual no parece constituir un problema alarmante, contrariamente a lo que se concluye considerando los resultados de los métodos disponibles para su diagnóstico y estudio a nivel del sistema nacional de salud en Cuba. Sin embargo, justamente la carencia de métodos de diagnósticos de *M. pneumoniae*, ni convencionales ni moleculares, excepto en el LNR-M en el IPK, impide conocer su carga sobre las enfermedades respiratorias y estimar la resistencia a los antimicrobianos de elección para su tratamiento.



Los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana de *M. pneumoniae* y *Ureaplasma* spp., obtenidos por el método de microdilución en caldo para determinar la CMI, permitieron demostrar una frecuencia mayor de resistencia a macrólidos en *M. pneumoniae*; mientras que para *Ureaplasma* spp. esta fue baja tanto para eritromicina como tetraciclina. Del mismo modo se confirmó la susceptibilidad absoluta a las fluoroquinolonas para ambas especies. Este resultado reafirma la necesidad de informar la susceptibilidad en micoplasmas y ureaplasmas utilizando la técnica de CMI con los criterios establecidos por la CLSI, y señala la inexactitud a la que conduce la estimación de este problema, basándose en la utilización de los estuches comerciales actualmente en uso en los laboratorios del Sistema Nacional de Salud para el diagnóstico y estudio de la susceptibilidad antimicrobiana de *Ureaplasma* spp.

En Cuba, como a nivel internacional, la levofloxacina y la moxifloxacina (fluoroquinolonas de 3<sup>era</sup> y 4<sup>ta</sup> generación, respectivamente) se distinguen como el tratamiento de elección más efectivo para las infecciones por micoplasmas y ureaplasmas. Sin embargo, ante la escasa disponibilidad de estos antibióticos en el cuadro básico nacional de medicamentos, las tetraciclinas pueden continuar recomendándose para el tratamiento de las infecciones urogenitales y la azitromicina deberá mantenerse como la elección inicial ante las infecciones respiratorias por *M. pneumoniae*, hasta constatar fracasos terapéuticos o contar con la posibilidad de demostrar en el laboratorio la resistencia específica. En esos casos, la tetraciclina podría erigirse como un tratamiento alternativo, excepto en los niños, donde su utilización dependerá del criterio médico.

Por otra parte, la detección de los mecanismos implicados en la resistencia a macrólidos permitió complementar en la presente investigación, el informe de aislados cubanos de *M. pneumoniae* y *Ureaplasma* spp. no susceptibles a estos antimicrobianos. De este modo se verificó la ausencia de las modificaciones genéticas más frecuentemente asociadas a

resistencia a macrólidos en *Ureaplasma* spp. y se justifica el hallazgo de aislados con bajos valores de CMI para eritromicina y azitromicina. Otros mecanismos no explorados en este estudio parecen ser los responsables de tales niveles de resistencia. De manera contraria, pero totalmente en correspondencia con lo descrito internacionalmente, se constataron los determinantes genéticos más frecuentemente asociados a la resistencia a macrólidos en *M. pneumoniae*, y esto avala el resultado que se informó a través de los métodos fenotípicos. Ambas observaciones permiten a la autora especular que la resistencia a macrólidos no es igualmente relevante en Cuba para *M. pneumoniae* y *Ureaplasma* spp., y también sobre diferencias en la rapidez en que esta lograría diseminarse. No obstante, no debe perderse de vista la necesidad de confirmar estas observaciones a través de una vigilancia activa.

Finalmente, considerando que en este estudio se advirtió como un problema inminente la resistencia a macrólidos en *M. pneumoniae*, explorar la relación entre genotipos específicos y la resistencia a esta familia de antibióticos constituyó uno de sus objetivos. Aunque la primera aproximación a este tema no indica tal relación, sí fue posible el hallazgo de varios genotipos, lo cual sugiere una gran diversidad genética de *M. pneumoniae* en Cuba. Esto deberá corroborarse en estudios futuros y establecer su asociación con la resistencia a macrólidos.

### **5.3.1. Limitaciones y fortalezas del estudio**

Con el presente estudio se logra un acercamiento al estado de la resistencia a los antimicrobianos de elección para el tratamiento de las infecciones por micoplasmas en Cuba, a través de la integración de pruebas fenotípicas y genotípicas.

A partir de los resultados de esta investigación descriptiva, en la que se incluyen muestras y aislados clínicos que se recibieron en el LNR-M en el IPK, a través de un sistema pasivo de vigilancia y diagnóstico, es posible generar una hipótesis sobre el fenómeno de la

resistencia de *Ureaplasma* spp y *M. pneumoniae* en Cuba. Esto adquiere especial relevancia si se toma en cuenta que los sistemas pasivos de vigilancia se sustentan en el análisis de datos secundarios y que por ende tienen sesgos, condicionados por el número de muestras/aislados que se reciben y que de estos no siempre se cuenta con la información del paciente (prescripción de antibióticos, curso de la infección, entre otros).

Se impone destacar como fortalezas de esta investigación el empleo de los métodos de referencia establecidos por las normas del CLSI para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana en *M. pneumoniae* y *Ureaplasma* spp. y su complementación con la detección de los mecanismos moleculares asociados a la resistencia. Asimismo, la caracterización genotípica de *M. pneumoniae* utilizando los métodos moleculares recomendados a nivel internacional.

Por otra parte es innegable la actualidad de los resultados, considerando el contexto en el que se presentan y discuten. La posible coexistencia de infecciones por micoplasmas respiratorios con otros patógenos siempre debe ser tomada en consideración. Este es el caso de pacientes con COVID-19 (Coronavirus Diseases 2019, siglas en inglés) en los que además del SARS-CoV-2 debe orientarse el diagnóstico de *M. pneumoniae*, entre otras infecciones bacterianas y virales que podrían incidir en la severidad de la enfermedad y en la mortalidad (Lai C-C *et al.*, 2020; Choubey A *et al.*, 2021; Riaz A *et al.*, 2021).

Como la mayoría de los pacientes sintomáticos con infección por SARS-CoV-2 desarrollan una neumonía atípica con fiebre, tos y falta de aire, la co-infección con *M. pneumoniae* se oculta y se hace difícil su diagnóstico solo con base en el cuadro clínico (Oliva A *et al.*, 2020). En pacientes pediátricos con COVID-19 se describe una co-infección elevada con *M. pneumoniae* y recientemente se documenta un caso de derrame pleural como complicación de una infección secundaria con *M. pneumoniae* en un paciente de 12 años (Lai C-C *et al.*, 2020; Chen H-R *et al.*, 2020).

## **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

- ✓ La frecuencia de resistencia a eritromicina y tetraciclina observada para *Ureaplasma* spp. permite desestimar los resultados previos obtenidos en Cuba a partir del uso de estuches comerciales, y ratifica el empleo de estos antibióticos para el tratamiento; en cambio, la resistencia a macrólidos en *Mycoplasma pneumoniae* revela un problema hasta ahora desconocido en el país para el que se impone una estrategia de vigilancia activa.
- ✓ La susceptibilidad de aislados de *Mycoplasma pneumoniae* y *Ureaplasma* spp. a moxifloxacina y levofloxacina sugiere que estas fluoroquinolonas se erigen como los antibióticos más efectivos para el tratamiento de las infecciones respiratorias y urogenitales que estas bacterias producen.
- ✓ La demostración del gen *tet(M)* en aislados de *Ureaplasma* spp. resistentes a tetraciclina permitió, al tiempo de su confirmación, avalar los resultados de la metodología de referencia para la detección de la CMI implementada en el LNR-M, IPK. Su demostración también en aislados sensibles indica que su detección es necesaria en los estudios de susceptibilidad de *Ureaplasma* spp. a tetraciclina.
- ✓ A partir de la demostración de que la resistencia a macrólidos en *Mycoplasma pneumoniae* se debe al mecanismo molecular más frecuente a nivel internacional (mutaciones en el ARNr 23S), y en contraposición, de la no detección de los mecanismos más comúnmente asociados a esta resistencia en *Ureaplasma* spp., se advierte que este fenómeno se desarrolle de manera distinta en ambas especies.
- ✓ No se demuestra relación entre genotipos específicos de *Mycoplasma pneumoniae* y la resistencia a macrólidos, pero se advierte una gran diversidad genética de esta especie en Cuba.

## **RECOMENDACIONES**

## RECOMENDACIONES

- ✓ Desaconsejar el uso en Cuba del sistema MYCO WELL D-ONE para el informe de la resistencia a los antimicrobianos; los resultados de este sector en dicho sistema deberán confirmarse a través de los métodos convencionales o moleculares.
- ✓ Verificar los resultados de la susceptibilidad a los antimicrobianos de elección para el tratamiento de las infecciones por *Mycoplasma pneumoniae* y *Ureaplasma* spp. obtenidos en la presente investigación, a través de estudios en los que se incluyan muestras y aislados de varios grupos poblacionales de interés y que resulten representativos de todas las regiones del país.
- ✓ Incorporar la detección de los genes *erm* y *msr* en el estudio para la detección de marcadores genéticos asociados a la resistencia a macrólidos en *Ureaplasma* spp.
- ✓ Realizar estudios que permitan establecer una posible relación entre los genotipos de *Mycoplasma pneumoniae* y la resistencia a macrólidos.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, B., Codina M.G., Matas, L., Meseguer M.A. (2011) Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Mycoplasma* spp. y *Ureaplasma* spp. *Procedimientos en microbiología clínica*. 40. p.5-53.
- Al-Sweih, N.A., Al-Fadli, A.H., Omu, A.E., Rotimi, V.O. (2012) Prevalence of *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, and *Ureaplasma urealyticum* infections and seminal quality in infertile and fertile men in Kuwait. *J Androl*. 33. p.1323-1329.
- Al-Zaidy S.A., MacGregor D., Mahant S., Richardson S.E., Bitnun A. (2015) Neurological complications of PCR-proven *M.pneumoniae* infections in children: prodromal illness duration may reflect pathogenetic mechanism. *Clin Infect Dis*. 61. p.1092-1098.
- Ando, M., Morozumi, M., Adachi, Y., Ubukata, K., Iwata, S. (2018) Multilocus sequence typing of *Mycoplasma pneumoniae*, Japan, 2002–2016. *Emerg Infect Dis*. 24. p.1895–1901.
- Atkinson, T.P., Waites K.B. (2014) *Mycoplasma pneumoniae* Infections in Childhood. ESPID Reports and Reviews. *Pediatr. Infect. Dis. J*. 33 (1). p.92-94.
- Bartkeviciene, D., Opolskiene, G., Bartkeviciute, A., Arlauskiene, A., Lauzikiene, D., Zakareviciene, J., et al. (2020) The impact of *Ureaplasma* infections on pregnancy complications. *Libyan J Med*. 15 (1). p.1812821.
- Bébéar, C.M. & Kempf, I. (2005). Antimicrobial therapy and antimicrobial resistance, p. 535-568. En: Blanchard, A. and Browning, G.F. (eds.). *Mycoplasmas: pathogenesis*,

molecular biology, and emerging strategies for control. Horizon Bioscience, Wymondham.

- Bébéar, C.M. & Pereyre, S. (2005) Mechanisms of drug resistance in *Mycoplasma pneumoniae*. *Curr Drug Targets Infect Disord*. 5. p.263-271.
- Bébéar, C.M., de Barbeyrac, B., Pereyre, S., Renaudin, H, Clerc, M., Bébéar, C. (2008). Activity of moxifloxacin against the urogenital micoplasmas *Ureaplasma* spp., *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* and *Chlamydia trachomatis*. *Clin Microbiol Infect*. 14. p.801-805.
- Bébéar, C. (2010) *Mycoplasma, Ureaplasma*. En: Courvalin, P., Leclercq, R., and Rice, L.B. (eds.). *Antibiogram*. Portland, ESKA publishing, ASM Press. p.519-529.
- Bébéar, C., Pereyre, S., Peuchant, O. (2011) *Mycoplasma pneumoniae*: susceptibility and resistance to antibiotics. *Future Microbiol*. 6. p.423-431.
- Beeton, M.L., Chalker, V.J., Maxwell, N.C., Kotecha, S., Spiller, O.B. (2009a) Concurrent Titration and Determination of Antibiotic Resistance in *Ureaplasma* Species with Identification of Novel Point Mutations in Genes Associated with Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 53 (5). p.2020-2027.
- Beeton, M.L., Chalker, V.J., Kotecha, S., Spiller, O.B. (2009b) Comparison of full gyrA, gyrB, parC and parE gene sequences between all *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* serovars to separate true fluoroquinolone antibiotic resistance mutations from non-resistance polymorphism. *J. Antimicrob. Chemother*. 64. p.529-538.
- Beeton, M.L. & Spiller, O.B. (2016) Antibiotic resistance among *Ureaplasma* spp. isolates: cause for concern? *J Antimicrob Chemother*. 72. p.330-337.

- Beeton, M.L., Chalker, V.J., Jones, L.C., Maxwell, N.C., Spiller, B. (2016) Antibiotic resistance among clinical *Ureaplasma* isolates recovered from neonates in England and Wales between 2007 to 2013. *Antimicrob Agents Chemother.* 60. p. 52-56.
- Beeton, M.L., Zhang, X.S., Uldum, S.A., Bébéar, C., Dumke, R., Gullsby, K., *et al.* (2020) *Mycoplasma pneumoniae* infections, 11 countries in Europe and Israel, 2011 to 2016. *Euro Surveill.* 25 (2). p.1900112.
- Benitez, A.J., Diaz, M.H., Wolf, B.J., Pimentel, G., Njenga, M.K., Estevez, A., *et al.* (2012) Multilocus variable-number tandem-repeat analysis of *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates from 1962 to the present: a retrospective study. *J Clin Microbiol.* 50. p. 3620-3626.
- Boujemaa, S., Mlik, B., Allaya, A.B., Mardassi H, Mardassi, B. (2020) Spread of multidrug resistance among *Ureaplasma serovars*, Tunisia. *Antimicrobial Resistance and Infection Control.* 9. p.19.
- Brand, M.C., Mandy, G.T., Arora, S., Castro, E.C., Gordon, P.S., Hagan, J.L., *et al.* (2018) Optimum detection of *Ureaplasma* in premature infants. *Pediatr Infect Dis J.* 37. p.1294-1298.
- Brooks, G.F., Butel, J.S., Morse, S.A. (2007) Micoplasmas y bacterias con pared celular defectuosa. En: Jawetz, E., Melnick, J.L., Adelberg, E.A. Eds. *Microbiología Médica.* Edn 16. México, DF: Manual Modern. p.369-73.
- Brown, D.R. (2010) Phylum XVI. Tenecutes. En: De Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Kreis, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., *et al.* (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* 2da edición vol.3. New York: Springer: 253-404.

- Brown, R.J., Holden, M.T., Spiller, O.B., Chalker, V.J. (2015) Development of a multilocus sequence typing scheme for molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 53. p.3195-3203.
- Cao, B., Qu, J.X., Yin, Y.D., Van Eldere, J. (2015) “Overview of antimicrobial options for *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia: focus on macrolide resistance,” *the Clinical Respiratory Journal.* 4. P. 419-429.
- Cao, X., Jiang, Z., Wang, Y., Gong, R., Zhang, C. (2007) Two multiplex real-time TaqMan polymerase chain reaction systems for simultaneous detecting and serotyping of *Ureaplasma parvum*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 59. p.109-111.
- Cervantes, E.G. (2009) Micoplasmas patógenos para el humano. *Rev Fac Med UNAM.* 52 (6). p.253-259.
- Chalker, V.J., Pereyre, S., Dumke, R., Winchell, J., Khosla, P., Sun, H., *et al.* (2015) International *Mycoplasma pneumoniae* typing study: interpretation of *M. pneumoniae* multilocus variable-number tandem-repeat analysis. *New Microbes New Infect.* 7. p.37-40.
- Chanock, R.M. & Tully, J.G. (1990) Mycoplasmas. En: Davis, B.D., Dubecco, R., Eisen, H.N., Ginisberg, H.S. (eds). *Tratado de Microbiología.* 3 ed. Barcelona: Salvat; 640-47.
- Chaudhry, R., Ghosh, A., Chandolia, A. (2016) Pathogenesis of *Mycoplasma pneumoniae*: An update. *Indian J Med Microbiol.* 34 (1). p.7-16.
- Chen, H.R., Zou, H., Xue, M., Chen, Z.B., Chen, W.X. (2020) A case of childhood COVID-19 infection with pleural effusion complicated by possible secondary mycoplasma pneumoniae infection. *Pediatr Infect Dis J.* 39. p.e135–e137.

- Chironna, M., Sallustio, A., Esposito, S., Perulli, M., Chinellato, I., Di Bari, C., *et al.* (2011) Emergence of macrolide-resistant strains during an outbreak of *Mycoplasma pneumoniae* infections in children. *J Antimicrob Chemother.* 66. p.734-737.
- Chopra, I. & Roberts, M. (2001) Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, cations, molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 65. p.232-260.
- Choubey, A., Sagar, D., Cawley, P., Miller, K. (2021) Retrospective review analysis of COVID-19 patients co-infected with *Mycoplasma pneumoniae*. *Lung India.* 38. Suppl S1. p.22-26.
- CITMA (2006) Resolución N° 38. Lista Oficial de los Agentes Biológicos que afectan al hombre, los animales y las plantas. Gaceta Oficial República de Cuba. 56. p.999-1001.
- Clegg, A., Passey, M., Yoannes, M., Michael A. (1997) High rates of genital mycoplasma infection in the highlands of Papua New Guinea determined both by culture and by a commercial detection kit. *J Clin Microbiol.* 35. p.197-200.
- CLSI. (2011) Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing for Human Mycoplasmas; Approved Guidelines. CLSI document M43-A. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Combaz-Söhnchen, N. & Kuhn, A. (2017) A Systematic Review of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* in Urogynaecology. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 77 (12). p. 1299-1303.
- Copete, A.R., Aguilar, Y.A., Rueda, Z.V., Vélez, L.A. (2018) Genotyping and macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* in children with community-acquired pneumonia in Medellin, Colombia. *Int J Infect Dis.* 66. p.113-120.

- Couldwell, D.L., Gidding, H.F., Freedman, E.V., McKechnie, M.L., Biggs, K., Sintchenko, V., *et al.* (2010) *Ureaplasma urealyticum* is significantly associated with non-gonococcal urethritis in heterosexual Sydney men. *Int J STD AIDS*. 21. p.337-341.
- Cousin-Allery, A., Charron, A., de Barbeyrac, B., Fremy, G., Jensen, J., Renaudin, H., *et al.* (2000) Molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* strains by PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. Application to French and Danish isolates. *Epidemiol Infect.* 124. p.103-111.
- Dallo, S.F., Horton, J.R., Su, C.J., Baseman, J.B. (1990) Restriction fragment length polymorphism in the cytoadhesin P1 gene of human clinical isolates of *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect.Immun.* 58. p.2017-2020.
- De Francesco, M.A., Negrimi, R., Pinsi, G., Peroni, L., Manca, M. (2009) *Ureaplasma* biovars and polymerase chain reaction-based subtyping of *Ureaplasma parvum* in women with or without symptoms of genital infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 28. p.641-646.
- Degrange, S., Renaudin, H., Charron, A., Pereyre, S., Bébéar, C., Bébéar, C.M. (2008) Reduced susceptibility to tetracyclines is associated in vitro with the presence of 16S rRNA mutations in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 61. p.1390-1392.
- Degrange, S., Cazanave, C., Charron, A., Renaudin, H., Bebear, C., Bebear, C.M. (2009) Development of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for the molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 47. p.914-923.

- Deguchi, T., Yoshida, T., Miyazawa, T., Yasuda, M., Tamaki, M., Ishiko, H., *et al.* (2004) Association of *Ureaplasma urealyticum* (biovar 2) with nongonococcal urethritis. *Sex Transm Dis.* 31. p.192–195.
- Dhawan, B., Gupta, V., Khanna, N., Singh, M., Chaudhry, R. (2006) Evaluation of the diagnostic efficacy of PCR for *Ureaplasma urealyticum* infection in Indian adults with symptoms of genital discharge. *Jpn J Infect Dis.* 59. p.57-58.
- Dhawan, B., Malhotra, N., Sreenivas, V., Rawre, J., Khanna, N., Chaudhry, R., *et al.* (2012) *Ureaplasma* serovars and their antimicrobial susceptibility in patients of infertility and genital tract infections. *Indian J Med Res.* 136. p.991-996.
- Díaz, F.J. & Flores, S. (2012) Relación entre infertilidad masculina e infección genitourinaria por micoplasmas. Una actualización. *Perinatol Reprod Hum.* 27 (1). p.2134.
- Diaz, L., Cabrera, L.E., Fernández, T., Ibañez, I., Torres, Y., Obregon, Y., *et al.* (2013) Frequency and Antimicrobial Sensitivity of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in Patients with Vaginal Discharge. *MEDICC Review.* 15 (4).
- Diaz, M.H., Benitez, A.J, Winchell, J.M. (2015a) Investigations of *Mycoplasma pneumoniae* infections in the United States: trends in molecular typing and macrolide resistance from 2006 to 2013. *J Clin Microbiol.* 53. p.124-130.
- Diaz, M.H., Benitez, A.J., Cross, K.E., Hicks, L.A., Kutty, P., Bramley, A.M., *et al.* (2015b) Molecular Detection and Characterization of *Mycoplasma pneumoniae* Among Patients Hospitalized With Community-Acquired Pneumonia in the United States. *Open Forum Infect Dis;* 2(3). p.1-6.

- Diaz, M.H. & Winchell, J.M. (2016) The Evolution of Advanced Molecular Diagnostics for the Detection and Characterization of *Mycoplasma pneumoniae*. *Front Microbiol.* 7. p.232.
- D'Inzeo, T., De Angelis, G., Fiori, B., Menchinelli, G., Liotti, F.M., Morandotti, GA., *et al.* (2017) Comparison of Mycoplasma IES, Mycofast Revolution and Mycoplasma IST2 to detect genital mycoplasmas in clinical samples. *J Infect Dev Ctries.* 11 (1). p. 98-101.
- Dirección de medicamentos y tecnologías médicas del Minsap. Cuadro básico de medicamentos y productos naturales. 2018. Disponible en <https://www.cecmecmed.cu/sites/default/files/adjuntos/vigilancia/farmacov/>
- Dongya, M., Wencheng, X., Xiaobo, M., Lu, W. (2008) Transition mutations in 23S rRNA account for acquired resistance to macrolides in *Ureaplasma urealyticum*. *Microb Drug Resist.* 14. p.183-186.
- Dorigo-Zetsma, J.W., Dankert, J., Zaat, S.A. (2000) Genotyping of *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates reveals eight P1 subtypes within two genomic groups. *J Clin Microbiol.* 38. p.965-970.
- Dorigo-Zetsma, J.W., Verkooyen, R.P., van Helden, H.P., van der Nat, H., van den Bosch, J.M. (2001) Molecular detection of *Mycoplasma pneumoniae* in adults with community-acquired pneumonia requiring hospitalization. *J Clin Microbiol.* 39. p.1184-1186.
- Dotres, C., Álvarez, M., Vega, D., Mondeja, B., Rodríguez, N., Fernández, C., *et al.* (2017) *Mycoplasma pneumoniae* y enfermedad respiratoria en niños y adolescentes. *Rev Cubana Pediatr.* 89 (4).



- Dumke, R., Catrein, I., Pirkil, E., Herrmann, R., Jacobs, E. (2003) Subtyping of *Mycoplasma pneumoniae* isolates based on extended genome sequencing and on expression profiles. *Int J Med Microbiol.* 292. p.513-525.
- Dumke, R., Lück, P.C., Noppen, C., Schaefer, C., von Baum, H., Marre, R., *et al.* (2006) Culture-independent molecular subtyping of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 44. p.2567-2570.
- Dumke, R., von Baum, H., Lück, P.C., Jacobs, E. (2010) Occurrence of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains in Germany. *Clin Microbiol Infect.* 16. p.613-616.
- Dumke, R. & Jacobs, E. (2011) Culture-independent multi-locus variable number tandem-repeat analysis (MLVA) of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Microbiol Methods.* 86. p.393-396.
- Dumke, R., Luck, C., Jacobs, E. (2013) Low rate of macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* strains in Germany between 2009 and 2012. *Antimicrob Agents Chemother.* 57. p.3460.
- Eshaghi, A., Memari, N., Tang, P., Olsha, R., Farrell, D.J., Low, D.E., *et al.* (2013) Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in humans, Ontario, Canada, 2010–2011. *Emerg Infect Dis.* 19(9).
- Feng, CH., Huang, Y., Yu, Y., Duan, G., Dai, Y., Dongs, K., *et al.* (2015) Effects on quinolone resistance due to the biofilm formation activity in *Ureaplasma urealyticum*. *Turk J Med Sci.* 45 (1). p.55-59.

- Fernández, J., Karau, M.J., Cunningham, S.A., Greenwood-Quaintance, K.E., Patel, R. (2016) Antimicrobial susceptibility and clonality of clinical *Ureaplasma* isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 60. p.4793-4798.
- Fernandez, R., Ratliff, A., Crabb, D., Waites, K.B., Bharat, A. (2017) *Ureaplasma* transmitted from donor lungs is pathogenic after lung transplantation. *Ann Thorac Surg.* 103. p.670-671.
- Foulon, W., Liedekerke, D., Demanet, C., Decatte, L., Dewaele, M., Naessens, A. (1995) Markers of infection and their relationship to preterm delivery. *Am J Perinatol.* 12. p.208-211.
- Gadsb, N.J, Reynolds, A.J., McMenamin, J., Gunson, R.N., McDonagh, S., Molyneaux, P.J., *et al.* (2012) Increased reports of *Mycoplasma pneumoniae* from laboratories in Scotland in 2010 and 2011—impact of the epidemic in infants. *Euro Surveill.* 17(10). p.201-210.
- Garrity, G.M., Lilburn, T.G., Cole, J.R., Harrison, S.H., Euzéby, J., Tindall B.J. (2007) The Bacteria: Phylum Firmicutes, Class Mollicutes. The Taxonomic outline of the Bacteria and Archaea. 8. 317-332.
- Garrity, W.M. & Seartes, D.B. (2001) Taxonomic outline of the Procariotic Fauna Bergeys Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition.
- Goldenberg, R.L., Andrews, W.W, Goepfert, A.R., Faye, O., Cliver, S.P., Carlo, W.A., *et al.* (2008) The Alabama Preterm Birth Study: Umbilical Cord Blood *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* Cultures in Very Preterm Newborns. *Am J Obstet Gynecol.* 198 (1). p. 43.e1-43.e5.

- Góngora, A., González, C., Parra, L.Y. (2015) Estudio retrospectivo en el diagnóstico de *Mycoplasma* y *Ureaplasma* en muestra seminal de 89 pacientes en la Ciudad de México. *Rev Facul Medic UNAM*. 58 (1). p.5-12.
- Govender, S., Gqunta, K., le Roux, M., de Villiers, B., Chalkley, L.J. (2012) Antibiotic susceptibilities and resistance genes of *Ureaplasma parvum* isolated in South Africa. *J Antimicrob Chemother*. 67. p.2821-2824.
- Gruson, D., Pereyre, S., Renaudin, H., Charron, A., Bébéar, C., Bébéar, C.M. (2005) In vitro development of resistance to six and four fluoroquinolones in *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma hominis*, respectively. *Antimicrob. Agents Chemother*. 49. p.1190-1193.
- Gue, X., Ye, Z., Deng, R. (2004) Male urogenital tract *Mycoplasma* infection and drug resistance evolution. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 10. p.122-124.
- Gullsbj, R., Olsen, B., Bondeson, K. (2019) Molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* strains in Sweden, 1996–2017, and the emergence of a new P1 cytoadhesin gene, Variant 2e. *J. Clin. Microbiol*. 57 (6). p.00049-19.
- Himmelreich, R., Hilbert, H., Plagens, H., Pirkl, E., Li, B.C., Herrmann, R. (1996) Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res*. 24. p.4420-4449.
- Ho, P.L., Law, P.Y., Chan, B.W., Wong, C.W., To, K.K., Chiu, S.S., *et al.* (2015) Emergence of Macrolide Resistant *Mycoplasma pneumoniae* in Hong Kong Is Linked to Increasing Macrolide Resistance in Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis Type 4-5-7-2. *J Clin Microbiol*. 53. p.3560-3564.

- Horner, P., Donders, G., Cusini, M., Gomberg, M., Jensen, J.S., Unemo, M. (2018) Should we be testing for urogenital *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* in men and women? – a position statement from the European STI Guidelines Editorial Board. *JEADV*. DOI: 10.1111/jdv.15146.
- Huang, C., Zhu, H.L., Xu, K.R., Wang, S.Y., Fan, L.Q., Zhu, W.B. (2015) Mycoplasma and ureaplasma infection and male infertility: a systematic review and meta-analysis. *Andrology*. 3. p.809-816.
- Huang, C., Long, X., Jing, S., Fan, L., Xu, K., Wang, S., *et al.* (2016) *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infections and semen quality in 19098 infertile men in China. *World J Urol*. 34. p.1039-1044.
- Hunjak, B., Sabol, I., Vojnovic, G. (2014) *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* in women of reproductive age. *Arch Gynecol Obstet*. 289. p.407-412.
- Ieven, M.M. & Loens, K. (2013) Should serology be abolished in favor of PCR for the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Curr Pediatr Rev*. 9. p.304-313.
- Ifeanyi, O.E. (2018) A Review on *Ureaplasma urealyticum*. *Int J Curr Res Med Sci*. 4 (2). p.66-74.
- Jacobs, E. (2012) *Mycoplasma pneumoniae*: now in the focus of clinicians and epidemiologists. *EuroSurveill*. 17. p.1-3.
- Jacobs, E., Ehrhardt, I., Dumke, R. (2015) New insights in the outbreak pattern of *Mycoplasma pneumoniae*. *Int J Med Microbiol*. 305. p.705-708.
- Jiang, Z., Li, S., Zhu, C., Zhou, R., Leung, P. (2021) *Mycoplasma pneumoniae* Infections: Pathogenesis and Vaccine Development. *Pathogens*. 10 (2). p.119.

- Juhásza, E., Ostorházi, E., Pónyai, K., Silló, P., Párducz, L., Rozgonyi, F. (2011) Ureaplasmas: from commensal flora to serious infections. *Reviews in Medical Microbiology*. 22. p.73-83.
- Kammer, J., Ziesing, S., Davila, L.A., Bultmann, E., Illsinger, S., Das, A.M., *et al.* (2016) Neurological manifestations of *Mycoplasma pneumoniae* infection in hospitalized children and their long-term follow-up. *Neuropediatrics*. 14. p.14.
- Kasprzykowska, U., Elias, J., Elias, M., Maczynska, B., Sobieszczanska, B. (2014) Colonization of the lower urogenital tract with *Ureaplasma parvum* can cause asymptomatic infection of the upper reproductive system in women: a preliminary study. *Arch Gynecol Obstet*. 289. p.1129-1134.
- Kassis, E., García, H., Prada, L., Salazar, I., Kassis J. (2018) Prevalence of *Mycoplasma pneumoniae* infection in pediatric patients with acute asthma exacerbation. *Arch. Argent. Pediatr*. 116. p.179–185.
- Kawai, Y., Nakura, Y., Wakimoto, T., Nomiyama, M., Tokuda, T., Takayanagi, T., *et al.* (2015) In vitro activity of five quinolones and analysis of the quinolone resistance-determining regions of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* in *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* clinical isolates from perinatal patients in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 59. p.2358-2364.
- Kenri, T., Okazaki, N., Yamazaki, T., Narita, M., Izumikawa, K., Matsuoka, M., *et al.* (2008) Genotyping analysis of *Mycoplasma pneumoniae* clinical strains in Japan between 1995 and 2005: type shift phenomenon of *M. pneumoniae* clinical strains. *J Med Microbiol*. 57. p.469-475.

- Kogoj, R., Mrvic, T., Praprotnik, M., Kese, D. (2015) Prevalence, genotyping and macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* among isolates of patients with respiratory tract infections, Central Slovenia, 2006 to 2014. *Euro Surveill.* 20.
- Kogoj, R., Praprotnik, M., Mrvič, T., Korva, M., Keše, D. (2018) Genetic diversity and macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* isolates from two consecutive epidemics in Slovenia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 37. p.99-107.
- Kokkayil, P. & Dhawan, B. (2015) Ureaplasma: Current perspectives. *Indian J Med Microbiol.* 33. p.205-214.
- Koletar, V.L. (2013) *Ureaplasma urealyticum* associated with elevated counts in preterm infants. The American Pediatric Society and the Society for Pediatric Research, *Medical Journals.* 8. p.65-67.
- Kong, F.Z., Ma, Z., James, G., Gordon, S., Gilbert, G.L. (2000a). Species identification and subtyping of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* using PCR-based assays. *J Clin Microbiol.* 38. p.1175-1179.
- Kong, F.Z., Ma, Z., James, G., Gordon, S., Gilbert, G.L. (2000b) Molecular genotyping of human *Ureaplasma* species based on multiple-banded antigen (MBA) gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol.* 50 (5). p.1921-1929.
- Kotrotsiou, T., Exindari, M., Diza, E., Gioula, A., Melidou, A., Malisiovas, N. (2015) Detection of the *tetM* resistance determinant among phenotypically sensitive *Ureaplasma* species by a novel real-time PCR method. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 81. p.85-88
- Kouegnigan, L.R., Ndong, J.C., Medzegue, S., Elisee-Ndam, M., Djoba, J.F. (2015) Genital Mycoplasma infections and their resistance phenotypes in an African setting. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 10. p.2326-2329.

- Krausse, R. & Schubert, S. (2010) In-vitro activities of tetracyclines, macrolides, fluoroquinolones and clindamycin against *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma* spp. isolated in Germany over 20 years. *Clin Microbiol Infect.* 16. p.1649-1655.
- Kumar, S., Roy, R.D., Sethi, G.R., Saigal, S.R. (2019) *Mycoplasma pneumoniae* infection and asthma in children. *Trop. Dr.* 49. p.117–119.
- Lai, C.C., Wang, C.Y., Hsueh, P.R. (2020) Co-infections among patients with COVID-19: the need for combination therapy with nonanti- SARS-CoV-2 agents. *J Microbiol Immunol Infect.* 53(4). p.505-512.
- Larsen, B. & Hwang, J. (2010) *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, and adverse pregnancy outcomes: a fresh look. *Infect Disease in Obst Gynecol.* p.1-7.
- Lee, E., Cho, H.J., Hong, S.J., Lee, J., Sung, H., Yu, J. (2017) Prevalence and clinical manifestations of macrolide resistant *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in Korean children. *Korean J Pediatr.* 60 (5). p.151-157.
- Lee, J.K., Seong, M.W., Shin, D., Kim, J-I., Han, M.S., Yeon, Y., *et al.* (2019) Comparative genomics of *Mycoplasma pneumoniae* isolated from children with pneumonia: South Korea, 2010–2016. *BMC Genomics.* 20. p.910.
- Lee, J.S., Kim, K.T., Lee, H.S., Yang, K.M., Seo, J.T., Choe, J.H. (2013) Concordance of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in infertile couples: impact on semen parameters. *Urology.* 81. p.1219-1224.
- Lluch-Senar, M., Cozzuto, L., Cano, J., Delgado, J., Llorens-Rico, V., Pereyre, S., *et al.* (2015) Comparative -omics in *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates reveals key virulence factors. *PLoS ONE.* 10 (9): e0137354.

- Loconsole, D., De Robertis, A., Mallamaci, R., Sallustio, A., Morea, A., Prato, R., *et al.* (2019) First Description of Macrolide-Resistant *Mycoplasma pneumoniae* in Adults with Community-Acquired Pneumonia in Italy. *BioMed Research International*. 1. p.1-5.
- Loens, K., Goossens, H., Ieven, M. (2010) Acute respiratory infection due to *Mycoplasma pneumoniae*: current status of diagnostic methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 29. p.1055-1069.
- Loens, K. & Ieven, M. (2016) *Mycoplasma pneumoniae*: current knowledge on nucleic acid amplification techniques and serological diagnostics. *Front Microbiol*. 7. p.448.
- López, M., Truffin, E., Lozano, O., Hernández, C., Choy, A., Mesa, L. Utilización del diagnosticador MYCO WELL D-ONE en muestras urogenitales de pacientes provenientes de varios servicios. Año 2016, *Congreso 80 Aniversario del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"*. La Habana, 4-8 diciembre 2017. Cuba.
- Lu Ch.Y., Yen, T.Y., Chang, L.Y., Liao, Y.J., Liu, H.H., Huang, L.M (2020) Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) of macrolide-susceptible and resistant *Mycoplasma pneumoniae* in children in Taiwan, *Journal of the Formosan Medical Association*. 119 (10). p.1539-1545.
- Machado, A.A., Zorzi, A.R., Gloria, A.E., Donadi E.A. (2001) Frequency of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* infection in women with Systemic Lupus Erythematosus. *Rev Soc Bras Med Trop*. 34 (3). p.243-247.
- Machado, L., Molinari, M.A., dos Santos, L., de Cordova, C.M. (2014) Performance of four commercial kits for laboratory diagnosis of urogenital mollicute infection. *Can J Microbiol*. 60. p.613-617.



- Madigan, T., Carey, W.A., Kaemingk, B., Patel, R. (2019) Low *Ureaplasma* Polymerase Chain Reaction Positivity Rate Among Newborns in a Neonatal Intensive Care Unit or Intermediate Special Care Nursery. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 38 (5).
- Marrero, C., Ramos, M., Guerra, M., Pérez, M., Faldraga, M. *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma* spp. en muestras de fondo de saco. Hospital Camilo Cienfuegos. Enero-Julio 2017, *Congreso 80 Aniversario del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"*. La Habana, 4-8 diciembre 2017. Cuba.
- Martínez, M.A., Ruiz, M., Zunino, E., Luchsinger, V., Aguirre, R., Avendaño, L.F. (2010) Identification of P1 types and variants of *Mycoplasma pneumoniae* during an epidemic in Chile. *J Med Microbiol*. 59 (8). p.925-929.
- Matsuoka, M., Narita, M., Okazaki, N., Ohya, H., Yamazaki, T., Ouchi, K., *et al.* (2004) Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 48. p.4624-4630.
- McAuliffe, L., Ellis, R.J., Miles, K. (2006) Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival. *Microbiol*. 152. p.913-922.
- Mesa, I., Ramírez, Y., Salazar, D., Castellanos, T., Guerrero, C., Rodríguez, Y. Identificación de *Mycoplasma/Ureaplasma* en gestantes, *Congreso 80 Aniversario del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"*. La Habana, 4-8 diciembre 2017. Cuba.
- Meseguer, M.A., Acosta, B., Matas, L., Codina, G. (2012) Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Mycoplasma*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 30 (8). p.500-504.
- Meyer-Sauteur, P.M., Moeller, A., Relly, C., Berger, C., Plecko, B., Nadal, D. (2016) Swiss national prospective surveillance of paediatric *Mycoplasma pneumoniae*-associated encephalitis. *Swiss Med Wkly*. 146.

- Meygret, A., Le Roy, C., Renaudin, H., Bebear, C., Pereyre, S. (2018) Tetracycline and fluoroquinolone resistance in clinical *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma hominis* isolates in France between 2010 and 2015. *J Antimicrob Chemother.* 73. p.2696-2703.
- Miyashita, N., Ouchi, K., Kawasaki, K., Oda, K., Kawai, Y., Shimizu, H., *et al.* (2008) *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in the elderly. *Med Sci Monit.* 14. p.387-391.
- Mondeja, B., Rodríguez, N., Toraño, G., Dotres, C., Illnait, Z., Tamargo, I. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by a novel ARI WELL D-ONE culture-based micro method. XXVI Congreso de la ECCMID, Amsterdam, 9-12 Abril 2016. Holanda,
- Morozumi, M., Tajima, T., Sakuma, M., Shouji, M., Meguro, H.i, Saito, K. (2020) Sequence Type Changes Associated with Decreasing Macrolide-Resistant *Mycoplasma pneumoniae*, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 26(9). p.2210-2213.
- Morris, D., Jones, L., Davies, R., Sands, K., Portal, E., Spiller, O. (2020) MYCO WELL D-ONE detection of *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma hominis* in sexual health patients in Wales. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 39. p. 2427–2440. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03993-7>.
- Muñoz, M.E. (2014) Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*. Febrero. [Disponible en: <http://www.aepap.org/grupos/grupo-de-patologia-infecciosa/contenido>].
- Narita, M. (2009) Pathogenesis of neurologic manifestations of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Pediatr Neurol.* 41. p.159-166.
- Narita, M. (2016) Classification of extrapulmonary manifestations due to *Mycoplasma pneumoniae* infection on the basis of possible pathogenesis. *Front Microbiol.* 7. p.23.

- Oliva, A., Siccardi, G., Migliarini A., Cancelli, F., Carnevalini, M., D'Andria, M., *et al.* (2020) Co-infection of SARS-CoV-2 with *Chlamydia* or *Mycoplasma pneumoniae*: a case series and review of the literature. *Infection*. 48. p.871–877.
- Okazaki, N., Narita, M., Yamada, S., Izumikawa, K., Umetsu, M., Kenri, T., *et al.* (2001) Characteristics of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated from patients and induced with erythromycin in vitro. *Microbiol Immunol*. 45. p.617-620.
- Okazaki, N., Ohya, H., Sasaki, T. (2007) *Mycoplasma pneumoniae* isolated from patients with respiratory infection in Kanagawa Prefecture in 1976-2006: emergence of macrolide-resistant strains. *Jpn J Infect Dis*. 60. p.325-326.
- Ortiz, C.E., Rivalta, M., O'Farril, E. Resistencia microbiana de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma* spp. Hospital Docente Ginecoobstétrico Ramón González Coro. 2011-2015, Congreso 80 Aniversario del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". La Habana, 4-8 diciembre 2017. Cuba.
- Pandelidis, K., McCarthy, A., Chesko, K.L., Viscardi, R.M. (2013) Role of biofilm formation in ureaplasma antibiotic susceptibility and development of bronchopulmonary dysplasia in preterm neonates. *Pediatr Infect Dis J*. 32. p.394-398.
- Paralanov, V., Lu, J., Duffy, L.B., Crabb, D.M., Shrivastava, S., Methé, B.A., *et al.* (2012) Comparative genome analysis of 19 *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* strains. *BMC Microbiol*. 12. p.88.
- Parrott, G.L., Kinjo, T., Fujita, J. (2016) A Compendium for *Mycoplasma pneumoniae*. *Front Microbiol*. 7. p.513.
- Payne, M.S., Goss, K.C., Connett, G.J., Legg, J.P., Bruce, K.D., Chalker, V. (2012) A quantitative analysis of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* compared with

host immune response in preterm neonates at risk of developing bronchopulmonary dysplasia. *J Clin Microbiol.* 50 (3). p.909-914.

- Payne, M.S., Tabone, T., Matthew, W., Jeffrey, A., Spiller, O.B., Newnham, J.P. (2014) High Resolution Melt PCR Analysis for Genotyping of *Ureaplasma parvum* Isolates Directly from Clinical Samples. *J Clin Microbiol.* 52 (2). p.599-606.
- Pereyre, S., Metifiot, M., Cazanave, C., Renaudin, H., Charron, A., Bebear, C., *et al.* (2007) Characterization of in vitro-selected mutants of *Ureaplasma parvum* resistant to macrolides and related antibiotics. *Int J Antimicrob Agents.* 29. p.207-211.
- Pereyre, S., Goret, J., Bebear, C. (2016) *Mycoplasma pneumoniae*: current knowledge on Macrolide resistance and treatment. *Front Microbiol.* 7. p.974.
- Pérez, M.F. & Almanza, C. (2001) Micoplasma y Ureaplasma. En: Llop, A., Valdés-Dapena, M.M., Zuazo, J.L. (eds.) *Microbiología y Parasitología Médicas*. La Habana: Editorial Ciencias Médicas. p.419-426.
- Piccinelli, G., Gargiulo, F., Biscaro, V., Caccuri, F., Caruso, A., De Francesco, M.A. (2017) Analysis of mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* serovars resistant to fluoroquinolones. *Infection, Genetics and Evolution.* 47. p.64-67.
- Pillai, S.C., Hacoheh, Y., Tantsis, E., Prelog, K., Merheb, V., Kesson, A., *et al.* (2015) Infectious and autoantibody-associated encephalitis: clinical features and long-term outcome. *Pediatrics.* 135(4). p.e974-984.
- Pollack, J.D. (1996) Cell metabolism methods for testing metabolic activities in *Mollicutes*. En: Razin, S., Tully, J.G. (eds). *Molecular and diagnostic procedures in Mycoplasmaology*. Vol 1. New York: Academic Press. p.277-286.

- Ponyai, K., Mihalik, N., Ostorhazi, E. (2013) Incidence and antibiotic susceptibility of genital mycoplasmas in sexually active individuals in Hungary. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 32. p.1423-1426.
- Qu, J., Chen, S., Bao, F., Gu, L., Cao, B. (2019) Molecular characterization and analysis of *Mycoplasma pneumoniae* among patients of all age with community-acquired pneumonia during an epidemic in China. *IJID.* 83. p.26-31.
- Ramírez, Y., Zayas, A., Mesa, I., Rodríguez, L., Ramos, M.N., Bell, Y. (2018) Infección por *Mycoplasmas* en mujeres infértiles. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología.* 44 (4).
- Razin, S. (1983) Identification of *Mycoplasma* colonies, En: Razin, S., Tully, J.G. (eds.). *Methods in Mycoplasmology.* 1. *New York: Academic Press.* p.83-88.
- Razin, S. & Cirilo, V.P. (1983) Sugar fermentation, En: Razin, S., Tully, J.G. (eds.). *Methods in Mycoplasmology.* 1. *New York: Academic Press.* p.337-345.
- Razin, S. & Hayflick, L. (2010) Highlights of *Mycoplasma* research and historical perspective. *Biologicals.* 38. p.183-190.
- Redelinghuys, M.J., Ehlers, M.E., Dreyer, A.W., Lombaard, H.A., Kock, M.M. (2013) Comparison of the new mycofast revolution assay with a molecular assay for the detection of genital mycoplasmas from clinical specimens. *BMC Infect Dis.* 13. p.453.
- Redelinghuys, M.J., Ehlers, M., Dreyer, A., Lombaard, H., Kock, M. (2014) Antimicrobial susceptibility patterns of *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis* in pregnant women. *BMC Infectious Diseases.* 14. p.171.

- Riaz, A.D., Vivek, U., Manna, M., Gireesh, K.K., Sreekrishnan, T., Sabarish, B.N. (2021) *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia during COVID pandemic. *Int J Health Sci Res.* 11(1). p.114-117.
- Rivera, J.A., Romero, O., del Rayo, M., Olea, S., Román, C. (2003) Viabilidad de micoplasmas de interés médico en presencia de diferentes antibióticos. *Rev Fac Med UNAM.* 46 (3). p.97-100.
- Rivera, J.A. (2006) Micoplasmas y antibióticos. *Salud Pública Mex.* 48 (1). p.1-2.
- Robertson, J.A. & Stemke, G.W. (1982) Expanded serotyping scheme for *Ureaplasma urealyticum* strains isolated from humans. *J Clin Microbiol.* 15. p.873-878.
- Robinson, J.W., Dando, S.J., Nitsos, I., Newnham, J., Polglase, G.R., Kallapur, S.G., *et al.* (2013) *Ureaplasma parvum* serovar 3 multiple banded antigen size variation after chronic intra-amniotic infection/colonization. *PLoS One.* 8. e62746.
- Rottem, S. (2003) Interaction of micoplasmas with host cells. *Physiol Rev.* 83. p.417-32.
- Sanger, F. & Coulson, A.R. (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 94 (3). p.441-448.
- Saraya, T. (2016) The History of *Mycoplasma pneumoniae* Pneumonia. *Front Microbiol.* 7. p.364.
- Sardiñas R. (2020) *Detección de Mycoplasma amphoriforme y Mycoplasma pneumoniae resistente a macrólidos en pacientes cubanos con infección respiratoria. 2019.* Tesis de Maestría. IPK. Disponible en: [www.ipk.sld.cu](http://www.ipk.sld.cu).
- Sasaki, T., Kenri, T., Okazaki, N., Iseki, M., Yamashita, R., Shintani, M., *et al.* (1996) Epidemiological study of *Mycoplasma pneumoniae* infections in Japan based on PCR-

restriction fragment length polymorphism of the P1 cytoadhesin gene. *J Clin Microbiol.* 34. p.447-449.

- Schneider, S.C., Tinguely, R., Droz, S., *et al.* (2015) Antibiotic susceptibility and sequence types distribution of *Ureaplasma* species isolated from genital samples in Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother.* 59. p.6026-6031.
- Schwartz, S.B., Mitchell, S.L., Thurman, K.A., Wolff, B.J., Winchell, J.M. (2009a) Identification of P1 variants of *Mycoplasma pneumoniae* by use of high resolution melt analysis. *J Clin Microbiol.* 47. p.4117-4120.
- Schwartz, S.B., Thurman, K.A., Mitchell, S.L., Wolff, B.J., Winchell, J.M. (2009b). Genotyping of *Mycoplasma pneumoniae* isolates using real-time PCR and high-resolution melt analysis. *Clin Microbiol Infect.* 15. p.756-762.
- Senterfit, L.B. Tetrazolium Reduction In Methods in Mycoplasmaology. Academic Press. 1: 377-378.
- Seral, C., Castillo, F.J., Rubio-Calvo, M.C., *et al.* (2001) Distribution of resistance genes tet(M), aph3'-III, catpC194276 and the integrase gene of Tn1545 in clinical *Streptococcus pneumoniae* harbouring erm(B) and mef(A) genes in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 47. p.863-866.
- Shimada, Y., Ito, S., Mizutani, K., Sugawara, T., Seike, K., *et al.* (2014) Bacterial loads of *Ureaplasma urealyticum* contribute to development of urethritis in men. *Int J STD AIDS.* 25. p.294-298.
- Shimizu, T., Kida, Y., Kuwano, K. (2008) *Ureaplasma parvum* lipoproteins, including MB antigen, activate NF- $\kappa$ B through TLR1, TLR2 and TLR6. *Microbiology.* 154. p.1318-1325.

- Silwedel, Ch., Speer, Ch.P., Härtel, Ch., Glaser, K. (2021) *Ureaplasma*-Driven Neuroinflammation in Neonates: Assembling the Puzzle Pieces. *Neonatology*. 117 (6). p.665–672.
- Simmons, W.L. & Dybvig, K. (2015) Catalase enhances growth and biofilm production of *Mycoplasma pneumoniae*. *Curr Microbiol*. 71. p.190-194.
- Smith, D.G., Russell, W.C., Ingledew, W.J., *et al.* (1993) Hydrolysis of urea by *Ureaplasma urealyticum* generates a transmembrane potential with resultant ATP synthesis. *J Bacteriol*. 175. p.3253-3258.
- Solís, R., Vázquez, T., Socorro, C., Hernández, L. (2006) Antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*. *Rev Méd Univ Veracruzana*. 6 (2). p.11-17.
- Song, J., Qiao, Y., Kong, Y., Ruan, Z., Huang, J., Song, T., *et al.* (2015) Frequent topoisomerase IV mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Ureaplasma* species. *J Med Microbiol*. 64. p.1315-1320.
- Su, C.J., Dallo, S.F., Baseman, J.B. (1990a). Molecular distinctions among clinical isolates of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 28. p.1538-1540.
- Su, C.J., Chavoya, A., Dallo, S.F., Baseman, J.B. (1990b). Sequence divergency of the cytadhesin gene of *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect. Immun*. 58. p.2669-2674.
- Su, H.C., Hutchinson, C.A., Giddings, M.C. (2007) Mapping phosphoproteins in *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae*. *BMC Microbiol*. 7. p.63.
- Sun, H., Xue, G., Yan, C., Li, S., Cao, L., Yuan, Y., *et al.* (2013) Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis of *Mycoplasma pneumoniae* clinical specimens and



proposal for amendment of MLVA nomenclature. *PLoS One*. 8:e64607.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064607>.

- Sun, H., Xue, G., Yan, C., Li, S., Zhao, H., Feng, Y., *et al.* (2017) Changes in molecular characteristics of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical specimens from children in Beijing between 2003 and 2015. *PLoS One*. 12 (1): e0170253.
- Sung, T.J., Xiao, L., Duffy, L., Waites, K.B., Chesko, K.L., Viscardi, R.M. (2011) Frequency of ureaplasma serovars in respiratory secretions of preterm infants at risk for bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Infect Dis J*. 30 (5). p.379-383.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 30 (12). p.2725-2729.
- Tanaka, T., Oishi, T., Miyata, I., Wakabayashi, S., Kono, M., Sahoko, O (2017) Macrolide-Resistant *Mycoplasma pneumoniae* Infection, Japan, 2008–2015. *Emerging Infectious Diseases*. 23 (10). p.1703–1706.
- Taylor-Robinson, D. (2002) Mycoplasmas. Atypical pneumonia; genital tract infection. In Greenwood, D., Slack, R.C., Peutlherer, J.F. (eds). *Medical microbiology: A guide to microbial infections*. 16 ed. Edinburg Churchill Livingstone. 379-388.
- Taylor-Robinson, D. (2017) Mollicutes in vaginal microbiology: *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* and *Mycoplasma genitalium*. *Res Microbiol*. 168. p.875-881.
- Touati, A., Cazanave, C., Bebear, C.M. (2013) Strain typing of *Mycoplasma pneumoniae* and its value in epidemiology. *Curr Pediatr Rev*. 9. p.334-342.

- Tsai, V., Pritzker, B.B., Diaz, M.H., Winchell, J.M., Hicks, LA, Petrone, B., *et al.* (2013) Cluster of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* infections in Illinois in 2012. *J Clin Microbiol.* 51. p.3889-3892.
- Tully, J.C. (1995) Culture medium formulation for primary isolation and maintenance of mollicutes. En: Razin, S., Tully, J.G. (eds). *Molecular and Diagnostic Procedure in Mycoplasmaology.* New York: Academic Press. p.33-39.
- Uh, Y., Hong, J.H., Oh, K.J., Cho, H.M., Park, S.D., Kim, J., *et al.* (2013) Macrolide Resistance of *Mycoplasma pneumoniae* and Its Detection Rate by Real-Time PCR in Primary and Tertiary Care Hospitals. *Ann Lab Med.* 33. p.410-414.
- Uldum, S.A., Bangsberg, J.M., Gahrn-Hansen, B., Ljung, R., Molvadgaard, M., Fons P.R., *et al.* (2012) Epidemic of *Mycoplasma pneumoniae* infection in Denmark, 2010 and 2011. *Euro Surveill.* 17 (5). pii20073.
- Ursi, D., Ieven, M., van Bever, H., Quint, W., Niesters, H.G., Goossens, H. (1994) Typing of *Mycoplasma pneumoniae* by PCR-mediated DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol.* 32. p.2873-2875.
- Urszula, K., Joanna, E., Marek, E., Beata, M., Beata, M. S. (2014) Colonization of the lower urogenital tract with *Ureaplasma parvum* can cause asymptomatic infection of the upper reproductive system in women: a preliminary study. *Arch Gynecol Obstet.* 289. p.1129-1134.
- Valentine-King, M., Brown, M. (2017) Antibacterial Resistance in *Ureaplasma* Species and *Mycoplasma hominis* Isolates from Urine Cultures in College-Aged Females. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 61 (10). p.1104-1117.

- Vancutsem, E., Soetens, O., Breugelmans, M., Foulon, W., Naessens, A. (2011) Modified real-time PCR for detecting, differentiating, and quantifying *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum*. *J Mol Diagn.* 13. p.206-212.
- Vancutsem, E., Faron, G., Foulon, W., Naessens, A. (2015) Genital tract colonization with *Ureaplasma* spp. and its association with abnormal vaginal flora. *J Med Microb.* 64. p. 654-656.
- Venuta, M.E., Ochoa, M.P., Hernández, C., Cadario, M.E. (2016) Optimización de un método de PCR en tiempo real para el diagnóstico de las infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*. *Med Infant.* 23. p.206-212.
- Villa, Y., Pérez, I. Prevalencia y Resistencia antimicrobiana de micoplasmas y ureaplasmas en mujeres con infección genital. Camaguey 2013-2015, *Congreso 80 Aniversario del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"*. La Habana, 4-8 diciembre 2017. Cuba
- Viscardi, R.M. (2014) *Ureaplasma* species: role in neonatal morbidities and outcomes. *Arch Dis Child Fetal Neonatal.* 99. p.87-92.
- Waites, K.B., Crouse, D.T., Cassell, G.H. (1993) Therapeutic considerations for *Ureaplasma urealyticum* infections in neonates. *Clin Infect Dis.* 17 Suppl 1: S208-14.
- Waites, K.B., Bebear, C.M., Robertson, J.A., Talkington, D.F., Kenny, G.E. (2001) *Cumitech 34: Laboratory Diagnosis of Mycoplasmal Infections*. Washington, DC: ASM Press.
- Waites, K.B. & Talkington, D.F. (2004) *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 17. p.697-728.

- Waites, K.B., Katz, B., Schelonka, R.L. (2005) Mycoplasmas and Ureaplasmas as neonatal pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 18 (4). p.757-789.
- Waites, K.B., Taylor-Robinson, D. (2007) Mycoplasma and Ureaplasma. En: Murray, P.R., Baron, E.J., Landry, M.L., Jorgensen, J.H., Tenover, P.C., Tenover, M. (eds.). *Manual of Clinical Microbiology.* 9<sup>th</sup> ed Washington DC: ASM Press. p.1004-1020.
- Waites, K., Balish, M., Atkinson, T. (2008) New insight into the pathogenesis and detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Future Microbiol.* 3 (6). p.635-648.
- Waites, K.B. (2008) *Mycoplasma* in clinical infectious disease, Schlossberg, D., (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, UK: 1145-1159.
- Waites, K.B., Crabb, D.M., Duffy, L.B. (2009) Comparative *in vitro* susceptibilities of human Mycoplasmas and Ureaplasmas to a new Investigational ketolide, CEM-101. *J Antimicrob. Chemother.* 53 (5). p.2139-2140.
- Waites, K.B., Xiao, L., Paralanov, V., Viscardi, R.M., John, I. (2012) Molecular Methods for the Detection of Mycoplasma and Ureaplasma Infections in Humans. *The J Molecular Diagnostics Review.* 14 (5). p.437-450.
- Waites, K.B., Lysnyansky, I., Bebear, C.M. (2014) Emerging antimicrobial resistance in mycoplasmas of humans and animals. In: *Mollicutes: molecular biology and pathogenesis.* UK: Caister Acad. Press, P. 350.
- Waites, K.B., Xiao, L., Liu, Y., Balish, M.F., Atkinson, T.P. (2017) *Mycoplasma pneumoniae* from the respiratory tract and beyond. *Clin Microbiol Rev.* 30 (3). p.747-809.

- Waites, K.B. & Bébéar, C. (2019) Mycoplasma and ureaplasma. En: Carroll, K.C., Pfaller, M.A., Landry, M.L., McAdam, A.J., Patel, R., Richter, S.S., *et al.* (eds.). Manual of clinical microbiology. 12th edition Washington DC: ASM Press.
- Waites, K.B., Ratliff, A., Crabb, D.M., Xiao, L., Qin, X., Selvarangan, R., *et al.* (2019) Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in the United States as determined from a national surveillance program. *J Clin Microbiol.* 57. p.e00968-19.
- Waller, J.L., Diaz, M.H., Petrone, B.L., Benitez, A.J., Wolf, B.J., Edison, L., *et al.* (2014) Detection and characterization of *Mycoplasma pneumoniae* during an outbreak of respiratory illness at a university. *J Clin Microbiol.* 52. p.849-853.
- Wen, X., Liu, J., Li, H., Zhao, S. (2018) Clinicoradiologic features of *Mycoplasma pneumoniae* bronchiolitis in children. *Pediatric Investigation.* 2 (4). p.248-252.
- Wetmore, C.M., Manhart, L.E., Lowens, M.S., Golden, M.R., Jensen, N.L., *et al.* (2011) *Ureaplasma urealyticum* is associated with nongonococcal urethritis among men with fewer lifetime sexual partners: a case-control study. *J Infect Dis.* 204. p.1274-1282.
- Winchell, J.M. (2013) *Mycoplasma pneumoniae*—a national public health perspective. *Curr Pediatr Rev.* 9. p.324-333.
- Windsor, H. (2010) Guidance on Mycoplasma contamination for everyone using cultured cells for their research or production. *Biologicals.* 38 (2). p.181-248.
- Wolff, B.J., Thacker, W.L., Schwartz, S.B., Winchell, J.M. (2008) Detection of macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* by real-time PCR and high-resolution melt analysis. *Antimicrob Agents Chemother.* 52. p.3542-3549.

- Xiao, L., Atkinson, T.P., Hagood, J., Makris, C., Duffy, L.B., Waites, K.B. (2009) Emerging macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* in children: detection and characterization of resistant isolates. *Pediatr Infect Dis J.* 28. p.693-696.
- Xiao, L., Glass, J.I., Paralanov, V., Yooseph, S., Cassell, G.H., Duffy, L.B. (2010) Detection and characterization of human *Ureaplasma* species and serovars by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 48. p.2715-2723
- Xiao, L., Crabb, D.M., Moser, S.A., Duffy, L.B., Glass, J.I., Paralanov, V. (2011) Extensive horizontal gene transfer in ureaplasmas from humans questions the utility of serotyping for diagnostic purposes. *J Clin Microbiol.* 49. p.2818-2826.
- Xiao, L., Crabb, D.M., Duffy, L.B., Paralanov, V., Glass, J.I., Waites, K.B. (2012) Chromosomal mutations responsible for fluoroquinolone resistance in *Ureaplasma* species in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 56(5). p. 2780–2783.
- Xiao, J., Liu, Y., Wang, M., Jiang, C., You, X., Zhu, C. (2014) Detection of *Mycoplasma pneumoniae* P1 subtype variations by denaturing gradient gel electrophoresis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 78. p.24-28.
- Xiao, L., Ptacek, T., Osborne, J.D., Crabb, D.M., Simmons, W.L., Lefkowitz, E.J., *et al.* (2015) Comparative genome analysis of *Mycoplasma pneumoniae*. *BMC Genomics.* 16(1). 610.
- Xiao, L., Ratliff, A.E., Crabb, D.M., Mixon, E., Qin, X., Selvarangan, R., *et al.* (2020) Molecular characterization of *Mycoplasma pneumoniae* isolates in the United States from 2012 to 2018. *J Clin Microbiol.* 58. p.e00710-20.

- Xue, G., Li, M., Wang, N., Zhao, J., Wang, B., Ren, Z. (2018) Comparison of the molecular characteristics of *Mycoplasma pneumoniae* from children across different regions of China. *PLOS ONE*. 13(8). e0198557.
- Yan, C., Sun, H., Lee, S., Selvarangan, R., Qin, X., Tang, Y.W., *et al* (2015) Comparison of molecular characteristics of *Mycoplasma pneumoniae* collected from U.S. and China. *J Clin Microbiol*. 53(12). p. 3891–3893.
- Yang, T., Pan, L., Wu, N., Wang, L., Liu, Z., Kong, Y., *et al*. (2020) Antimicrobial resistance in clinical *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma hominis* and structural mechanisms underlying the quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. doi: 10.1128/AAC.02560-19.
- Ye, G., Jiang, Z., Wang, M., *et al*. (2014) The resistance analysis of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in female reproductive tract specimens. *Cell Biochem Biophys*. 68. p.207-210.
- Yoshida, T., Ishiko, H., Yasuda, M., Takahashi, Y., Nomura, Y., *et al*. (2005) Polymerase chain reaction based subtyping of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* in first-pass urine samples from men with or without urethritis. *Sex Transm Dis*. 32. p.454-457.
- Zeng, X.Y., Xin, N., Tong, X.N., Wang, J.Y., Liu, Z.W. (2016) Prevalence and antibiotic susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in Xi'an, China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 35. p.1941-1947.
- Zhang, J., Kong, Y., Feng, Y., Huang, J., Song, T., Ruan, Z., *et al*. (2014a) Development of a multilocus sequence typing scheme for *Ureaplasma*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 33. p.537-544.

- Zhang, J., Kong, Y., Ruan, Z., Huang, J., Song, T., Song, J., *et al.* (2014b) Correlation between *Ureaplasma* subgroup 2 and genitourinary tract disease outcomes revealed by an expanded multilocus sequence typing (eMLST) scheme. *PLoS One*. 9. e104347.
- Zhang, N., Wang, R., Li, X., Liu, X., Tang, Z., Liu, Y. (2014) Are *Ureaplasma* spp. a Cause of Nongonococcal Urethritis? A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE*. 9 (12). p.e113771.
- Zhang, Y., Hua, C.H., Li, S. (2017) The relationship between the biovars and the antimicrobial resistance of *Ureaplasma urealyticum* in female patients with urogenital infections. *Wiley*. DOI: 10.1002/jcla.22211.
- Zhao, H., Shaoli, L., Ling, C., Yi, Y., Guanhua,X., Yanling, F., *et al.* (2014) Surveillance of *Mycoplasma pneumoniae* infection among children in Beijing from 2007 to 2012. *Chin Med J*. 127 (7). p.1244–8.
- Zhao, F., Liu, J., Shi, W., Huang, F., Liu, L., Zhao, S., *et al.* (2019) Antimicrobial susceptibility and genotyping of *Mycoplasma pneumoniae* isolates in Beijing, China, from 2014 to 2016. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 8 (18).
- Zheng, X., Lee, S., Selvarangan, R., Qin, X., Tang, Y.W., Stiles, J., *et al.* (2015) Macrolide-Resistant *Mycoplasma pneumoniae*, United States. *Emerg Infect Dis*. 21. p.1470–2.
- Zhou, Z., Li, X., Chen, X., Yao, L., Pan, C., Huang, H., *et al.* (2015). Comparison of P1 and 16S rRNA genes for detection of *Mycoplasma pneumoniae* by nested PCR in adults in Zhejiang, China. *J Infect Dev Ctries*. 9. p.244–253.



**ANEXOS**

## ANEXO 1.

**Secuencia de los cebadores y sondas utilizados durante el estudio para la determinación de la susceptibilidad a antimicrobianos de aislados cubanos de *Ureaplasma* spp. y *Mycoplasma pneumoniae*, 2012-2018.**

| Especie               | Gen diana                                   | Cebadores y secuencia (5'-3')                                       | Referencias  |
|-----------------------|---|---|--|
| <i>Ureaplasma</i> spp | Ureasa.                                     | UU-15244R- TTCCTGTTGCCCTCAGTCT<br>UU1613F- AAGGTCAAGGTATGGAAGATCCAA | Payne MS y col, 2012   |
|                       | <i>tet</i> (M)                              | tetM_775- ATTTCCGCAAAGTTCAGACG<br>tetM_302- AAAAGATGGCGTACAAGCAC    | Spiller B (no publicado)<br>Donación del laboratorio de Micoplasmas, Universidad de Cardiff, Gales |
|                       | Dominio II ARNr 23S                         | UP23S-30- TGCCTTTTGAAGTATGAGCC<br>UP23S-31- TGGCGCCATCATAGATTCAG    | Pereyre S y col, 2007  |
|                       | Dominio V<br>ARNr23SA                       | MH23S-11- TAACTATAACGGTCCTAAGG<br>MP23S-22- GGCGACCGCCCCAGTCAAAC    | Pereyre S y col, 2007  |
|                       | L4  | UPL4-U- TCTATTGATGGTAACTTCGC<br>UPL4-R- GTTGAAGGTGTTTCTAAATCGC      |  |
|                       | L22   | UPL22-U- TTCGCACCGTAAAGCTTCTC<br>UPL22-R- GTTCTGGATCAACGTTTTTCG     |  |
| <i>M. pneumoniae</i>  | ARNr 23S<br>(1 <sup>ra</sup> amplificación) | MN23SDVF- GCAGTGAAGAACGAGGGG<br>MN23SDVR- GTCCTCGCTTCGGTCCTCTCG     | Dumke R y col, 2010  |

|   |  |                       |
|---|--|-----------------------|
| ARNr 23S<br>(PCR anidada)                   | MN23SDVFn-<br>GACTGTTTAACTAAAACACA ACTCTATG<br>MN23SDVRn- CTA GAA GCA ACA CTC TTC AAT CTT<br>C |                       |
| repMp2/3, extremo 5'<br>(1ra amplificación) | Mp5f -TTGACAAGACCGTCCAATCC-3'<br>Mp16r -TTGGTTGGGTATCTTGATCAGG-3'                              | Dumke R y col, 2006   |
| repMp2/3, extremo 5'<br>(PCR anidada)       | Mp11f (5'-CCTCGTTGTCAGTGGCACC-3')<br>Mp14r (5'-GCTGGGTGGAATGGTCTGTAC                           |                       |
| repMp2/3, extremo 3'<br>(1ra amplificación) | Forward- CCA ACA GTG AAA CGA GGT C<br>Reverse- ACC CGT CAG TTT GTT TGT TG                      |                       |
| repMp2/3, extremo 3'<br>(PCR anidada)       | Forward- CTG TAC GAT GCG CCT TAT GC<br>Reverse- CAC CCT AAA GAC ACC TAT ACT CAA AC             |                       |
| repMp4, ext 3'<br>(1ra amplificación)       | Forward- TTG ACA AGA CCG TCC AAT CC<br>Reverse- GTT TCC GTC ACT CGT GCT TC                     | Gullsby R y col, 2019 |
| repMp4, extremo 3'<br>(PCR anidada)         | Forward- GGG AAT GGG TAC AGG TAT GG<br>Reverse- GTT TCC GTC ACT CGT GCT TC                     |                       |
| Mpn13<br>(1ra amplificación)                | Mpn13-F- GACCAGCATTAGATTGCTATG<br>Mpn13-R- AACAAATTAAGCAGCTCACG                                | Dumke R y col, 2011   |
| Mpn13<br>(PCR anidada)                      | Mpn13n-F- GTTTGCTAATTATCTCATGAATGGC<br>Mpn13n-R- GTGGTGCGCAGTGACAATG                           |                       |

|                              |   |                      |
|------------------------------|---|----------------------|
| Mpn14<br>(1ra amplificación) | Mpn14-F- CTCAGGGCGAAACCTTAAAG<br>Mpn14-R- GCAATGGCTTTCAGCACAAC          |                      |
| Mpn14<br>(PCR anidada)       | Mpn14n-F- GGCGAGCAAATTAAGAACTTC<br>Mpn14n-R- CTGTTCCCACACTTATTTGATTAATG |                      |
| Mpn15<br>(1ra amplificación) | Mpn15-F- CAACAGCACCACATCTTTAG<br>Mpn15-R- GCTAATCTTGCAAACGCTGC          |                      |
| Mpn15<br>(PCR anidada)       | Mpn15n-F- CTTTCAGCACAATTGATGTATCTC<br>Mpn15n-R- GAATCCAGGTTGAGCAAATTAAG |                      |
| Mpn16<br>(1ra amplificación) | Mpn16-F- GACGCGTTCGCTAAAAGAG<br>Mpn16-R- CAGGCTCAACCAAATAATGG           |                      |
| Mpn16<br>(PCR anidada)       | Mpn16n-F- CCTTGATTGTGGTGTGCTGAG<br>Mpn16n-R- GATTCCGCTTAAACTGCAGG       |                      |
| <i>ppa</i>                   | F- CGCTGACCAAGCCTTTCTAC<br>R- CACTCCAAACTTTGCACTCCC                     | Brown RJ y col, 2015 |
| <i>pgm</i>                   | F- AGCACCTTGCACGATGAAGA<br>R- CCTGCGCCTTCGTTAATTGG                      |                      |
| <i>gyrB</i>                  | F- TTGTCCCGGACTTTACCGTG<br>R- TGTTTTTCGACAGCAAAGCGG                     |                      |
| <i>gmk</i>                   | F- GAGCGGTGTTGGCAAAGTA<br>R- TGCATCCTCGTCATTACGCTT                      |                      |

|  |             |  |  |
|--|-------------|--|--|
|  | <i>glyA</i> | F- CAGAGAACTATGTGAGTAGGGACA<br>R- TGACAACCCGGAAAGACACC |  |
|  | <i>atpA</i> | F- GTCGCTGATGGCATTGCTAAG<br>R- CCAGTAAACGCGAGTGCAAG    |  |
|  | <i>arcC</i> | F- CCCCATCAAGCCGTGTACTT<br>R- TTGGGCAATAATGGCCGTCT     |  |
|  | <i>adk</i>  | F- GTAGCCAACACCACCGGATT<br>R- ACGGTGTCTTCGTAAAGCGT     |  |

| <b>Especie</b>        | <b>Gen diana</b> | <b>Sondas y secuencia (5´-3´)</b>   | <b>Referencias</b>  |
|-----------------------|------------------|---|---|
| <i>Ureaplasma spp</i> | Ureasa.          | UUparvo (6-[FAM]-TCCACAAGCTCCAGCAGCAATT<br>TG-BHQ1)<br>UU-T960 (ROX-CCACAAGCACTGCTACGATTTGTTC-<br>BHQ2) | Payne MS y col, 2012  |
|                       | <i>tet(M)</i>    | tetMqPCR1309F (GTGCCGCCAAATCCTTTCTG)  | Spiller B (no publicado)<br>Donación del laboratorio<br>de Micoplasmas,<br>Universidad de Cardiff,<br>Gales |

## ANEXO 2.

Características de los *locus* empleados en la genotipificación de *Mycoplasma pneumoniae* mediante MLVA y MLST.

**Tabla 1. Características de los *locus* empleados en la genotipificación mediante MLVA.**

| Nombre <i>locus</i> | Posición en el genoma (pb) | Locus (# de proteína en la secuencia del genoma) | Tallas repetidas (pb) | % similitud entre tandas repetidas. |
|---------------------|----------------------------|--|-----------------------|-------------------------------------|
| Mpn13               | 596741                     | Intergénica                                      | 16                    | 83                                  |
| Mpn14               | 608651                     | Proteína hipotética (MPN 501)                    | 21                    | 84                                  |
| Mpn15               | 645561                     | Proteína hipotética (MPN 524)                    | 21                    | 81                                  |
| Mpn16               | 736123                     | Proteína hipotética (MPN 613)                    | 47                    | 100                                 |

**Tabla 2. Características de los *locus* empleados en la genotipificación mediante MLST.**

| Nombre <i>locus</i> | Posición en el genoma (pb) | Tipo de proteína que codifica        | Número de alelos |
|---------------------|----------------------------|--------------------------------------|------------------|
| <i>ppa</i>          | 192–440                    | Fosfatasa inorgánica                 | 2                |
| <i>pgm</i>          | 456–1652                   | Fosfoglicerasamutasa                 | 8                |
| <i>gyrB</i>         | 524–952                    | Subunidad $\beta$ de la ADN girasa   | 3                |
| <i>gmk</i>          | 189–582                    | Quinasa guanilada                    | 3                |
| <i>glyA</i>         | 74–749                     | Hidroximetiltransferasa serina A     | 7                |
| <i>atpA</i>         | 100–895                    | Subunidad $\alpha$ de la ATP sintasa | 4                |
| <i>arcC</i>         | 304–873                    | Quinasa carbamada                    | 6                |
| <i>adk</i>          | 70–542                     | Quinasa adenilasa                    | 7                |

ANEXO 3

Tabla. Subtipos P1, genotipos MLVA y Secuencias Tipo por MLST de *M. pneumoniae*, LNR-M, Cuba, 2012 y 2017.

| No. | ID        | Año recuperación | Mutación | Subtipos P1 | Genotipo MLVA |    |    |    | MLST |     |      |     |      |      |     |     |       |
|-----|-----------|------------------|----------|-------------|---------------|----|----|----|------|-----|------|-----|------|------|-----|-----|-------|
|     |           |                  |          |             | 13            | 14 | 15 | 16 | ppa  | pgm | gyrB | gmk | glyA | atpA | arC | adk | ST    |
| 1   | M.p 2115  | 2012             | -        | 1           | 4             | 5  | 7  | 2  | 1    | 2   | 1    | 1   | 1    | 3    | 1   | 1   | 3     |
| 2   | M.p 1     | 2012             | -        | 1           | 4             | 5  | 7  | 2  | 1    | 2   | 1    | 1   | 1    | 3    | 1   | 1   | 3     |
| 3   | M.p 2     | 2012             | -        | 1           | 4             | 5  | 7  | 2  | 1    | 2   | 1    | 1   | 1    | 3    | 1   | 1   | 3     |
| 4   | M.p 3     | 2012             | -        | 1           | 4             | 5  | 7  | 2  | 1    | 2   | 1    | 1   | 1    | 3    | 1   | 1   | 3     |
| 5   | M.p 4     | 2012             | -        | 1           | 4             | 5  | 7  | 2  | 1    | 2   | 1    | 1   | 1    | 3    | 1   | 1   | 3     |
| 6   | M.p 5     | 2012             | A2063G   | 1           | 4             | 5  | 7  | 2  | 1    | 2   | 1    | 1   | 1    | 3    | 1   | 1   | 3     |
| 7   | M.p 6     | 2012             | A2063G   | 1           | 4             | 5  | 7  | 2  | 1    | 2   | 1    | 1   | 1    | 3    | 1   | 1   | 3     |
| 8   | M.p 7     | 2012             | -        | 1           | 4             | 5  | 7  | 2  | 1    | 2   | 1    | 1   | 2    | 3    | 1   | 1   | nueva |
| 9   | M.p 8     | 2012             | -        | 2           | 3             | 5  | 6  | 2  | 2    | 3   | 2    | 2   | 1    | 4    | 1   | 1   | nueva |
| 10  | M.p 10    | 2012             | -        | V2a         | 3             | 5  | 6  | 2  | 2    | 3   | 2    | 2   | 4    | 4    | 1   | 5   | 14    |
| 11  | M.p 11    | 2012             | A2064G   | V2a         | 3             | 5  | 6  | 2  | 2    | 3   | 2    | 2   | 4    | 4    | 1   | 5   | 14    |
| 12  | M.p 13    | 2012             | -        | 1           | 4             | 5  | 7  | 2  | 1    | 2   | 1    | 1   | 1    | 3    | 1   | 1   | 3     |
| 13  | M.p 14    | 2012             | -        | V2a         | 3             | 5  | 6  | 2  | 2    | 3   | 2    | 2   | 4    | 4    | 1   | 5   | 14    |
| 14  | M.p 15    | 2012             | A2064G   | V2c         | 3             | 5  | 6  | 2  | 2    | 3   | 2    | 2   | 4    | 4    | 1   | 5   | 14    |
| 15  | M.p 16    | 2012             | -        | V2c         | 3             | 5  | 6  | 2  | 1    | 3   | 2    | 2   | 4    | 4    | 1   | 5   | nueva |
| 16  | M.p 17    | 2012             | -        | V2a         | 3             | 5  | 6  | 2  | 2    | 3   | 2    | 2   | 4    | 4    | 1   | 5   | 14    |
| 17  | M.p 2178  | 2012             | -        | 1           | 4             | 5  | 7  | 2  | 1    | 2   | 1    | 1   | 1    | 3    | 1   | 1   | 3     |
| 18  | M.p M10B  | 2012             | -        | V2a         | 3             | 5  | 6  | 2  | 2    | 3   | 2    | 2   | 1    | 4    | 1   | 5   | nueva |
| 19  | M.p 2182R | 2012             | -        | 1           | 4             | 5  | 7  | 2  | 1    | 2   | 1    | 1   | 1    | 3    | 1   | 1   | 3     |
| 20  | M.p 25    | 2012             | -        | 1           | 4             | 5  | 7  | 2  | 1    | 2   | 1    | 1   | 1    | 3    | 1   | 1   | 3     |

|    |        |      |        |     |                                     |   |       |
|----|--------|------|--------|-----|-------------------------------------|---|-------|
| 21 | M.p 12 | 2017 | -      | 2   | <b>3</b> <b>5</b> <b>6</b> <b>2</b> | <b>2</b> <b>3</b> <b>2</b> <b>2</b> <b>2</b> <b>4</b> <b>1</b> <b>5</b> | nueva |
| 22 | 20     | 2017 | -      | V2c | <b>3</b> <b>5</b> <b>6</b> <b>2</b> | 2 3 2 2 4 4 1 5   | 14    |
| 23 | 12     | 2017 | -      | V2c | <b>3</b> <b>5</b> <b>6</b> <b>2</b> | <b>2</b> <b>3</b> <b>2</b> <b>2</b> <b>2</b> <b>4</b> <b>1</b> <b>5</b> | nueva |
| 24 | 486    | 2017 | A2063G | 1   | <b>4</b> <b>5</b> <b>7</b> <b>2</b> | 1 2 1 1 1 3 1 1   | 3     |
| 25 | 267    | 2017 | -      | V2c | <b>3</b> <b>5</b> <b>6</b> <b>2</b> | 2 3 2 2 4 4 1 5   | 14    |
| 26 | 119    | 2017 | -      | V2c | <b>3</b> <b>5</b> <b>6</b> <b>2</b> | 2 3 2 2 4 4 1 5   | 14    |
| 27 | 235    | 2017 | -      | V2c | <b>3</b> <b>5</b> <b>6</b> <b>2</b> | 2 3 2 2 4 4 1 5   | 14    |
| 28 | 167    | 2017 | A2063G | 1   | <b>4</b> <b>5</b> <b>7</b> <b>2</b> | 1 2 1 1 1 3 1 1   | 3     |
| 29 | 169    | 2017 | A2063G | 1   | <b>4</b> <b>5</b> <b>7</b> <b>2</b> | 2 3 2 2 4 4 1 5   | 3     |
| 30 | 170    | 2017 | -      | 1   | <b>4</b> <b>5</b> <b>7</b> <b>2</b> | 1 2 1 1 1 3 1 1   | 3     |
| 31 | 171    | 2017 | -      | 1   | <b>4</b> <b>5</b> <b>7</b> <b>2</b> | 1 2 1 1 1 3 1 1   | 3     |
| 32 | 178    | 2017 | -      | 1   | <b>4</b> <b>5</b> <b>7</b> <b>2</b> | 1 2 1 1 1 3 1 1   | 3     |
| 33 | 433    | 2017 | -      | V2c | <b>3</b> <b>5</b> <b>6</b> <b>2</b> | 2 3 2 2 4 4 1 5   | 14    |
| 34 | 434    | 2017 | A2063G | 1   | <b>4</b> <b>5</b> <b>7</b> <b>2</b> | 1 2 1 1 1 3 1 1   | 3     |
| 35 | 451    | 2017 | A2063G | 1   | <b>4</b> <b>5</b> <b>7</b> <b>2</b> | 1 2 1 1 1 3 1 1   | 3     |
| 36 | 464    | 2017 | -      | 1   | <b>4</b> <b>5</b> <b>7</b> <b>2</b> | 1 2 1 1 1 3 1 1   | 3     |
| 37 | 502    | 2017 | -      | 1   | <b>4</b> <b>5</b> <b>7</b> <b>2</b> | 1 2 1 1 1 3 1 1   | 3     |
| 38 | 504    | 2017 | -      | V2c | <b>3</b> <b>5</b> <b>6</b> <b>2</b> | 2 3 2 2 4 4 1 5   | 14    |
| 39 | 514    | 2017 | -      | 1   | <b>4</b> <b>5</b> <b>7</b> <b>2</b> | 1 2 1 1 1 3 1 1   | 3     |
| 40 | 519    | 2017 | -      | V2c | <b>3</b> <b>5</b> <b>6</b> <b>2</b> | 2 3 2 2 4 4 1 5   | 14    |

Leyenda:

ID: Código del aislado o muestra, según corresponda. Todos los códigos a los que se antepone M.p se corresponden con aislados, el resto son muestras.

Líneas en verde se corresponden con el subtipo 1, líneas azules con el subtipo 2, líneas rosadas con el subtipo V2a, líneas blancas con el subtipo V2c.

Los dos genotipos MLVA demostrados se diferencian en números rojos y en negritas sostenidas.

Las secuencias tipo nuevas demostradas por MLST se resaltan en azul y negritas sostenidas.



**PRODUCCIÓN CIENTÍFICA  
DEL AUTOR SOBRE EL  
TEMA DE LA TESIS**

## PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR SOBRE EL TEMA DE LA TESIS

### PUBLICACIONES

- **Rodríguez NM**, Rivera-Tapia JA, Fernández C, Mondeja BA, Echevarria E, Verdasquera D. Detection of urogenital mycoplasmas in Cuban women with infertility antecedents. *J Pure Appl Microbio* 2014; 08 (1): 171-175.
- **Rodríguez N**, Rivera A, Fernández C, Mondeja B, Alvarez A. Urogenital Mycoplasmas Detection in New Born Child's with Respiratory Complications. *Int J Sci* 2016; 5 (07).
- **Rodríguez NM**. Evaluation of an accelerated micro-method for the detection, identification and antimicrobial susceptibility of urogenital mycoplasmas. *J Bacteriol Parasitol* 2016; 7:2 (Suppl).
- **Rodríguez N**, Mondeja B, Sardiña R, Vega D, Dumke R. First detection and characterization of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains in Cuba. *Int J Inf Dis* 2019; 80: 115–117.
- Dumke R, **Rodríguez N**. Use of different approaches for the culture-independent typing of *Mycoplasma pneumoniae* from two geographically distinct regions. *J Microbiol Methods* 2021 (aceptada).
- **Rodríguez N**, Spiller B, Mondeja B, Sardiñas R, Ramirez Y, Rivera-Tapia JA. Antibiotic Resistance among Clinical *Ureaplasma* Isolates from Cuban individuals between 2013 and 2018. *J Med Microbiol* (JMM-D-21-00256, en revisión).

## PRESENTACIÓN DE RESULTADOS EN EVENTOS CIENTÍFICOS

1. 20 Congreso de la Organización Internacional de Micoplasmatología (IOM), Brasil. 1-6 de junio de 2014. “Antimicrobial Susceptibility of Cuban *Ureaplasma parvum* strains isolated from patients with urogenital infections”. Autor principal: **Rodríguez N.**
2. VIII Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología, V Congreso Nacional de Medicina Tropical y V Seminario Internacional sobre la Infección por el VIH y el SIDA. 2014. Cuba. “Susceptibilidad antimicrobiana de cepas cubanas de *Ureaplasma* spp. aisladas de pacientes con infecciones urogenitales”. Presentación oral: **Rodríguez N.**
3. IV Taller de Resistencia Antimicrobiana en Bacterias y Hongos patógenos. La Habana, Cuba. 4-6/Noviembre/2015. “Susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos cubanos de *Ureaplasma* spp. provenientes de pacientes con infecciones urogenitales”. Autor principal: **Rodríguez N.**
4. Feria Internacional Salud para Todos. La Habana, Cuba. Abril 2015. “Evaluación de un micro método acelerado para la detección, identificación y susceptibilidad antimicrobiana de los micoplasmas urogenitales”. Presentación oral: **Rodríguez N.**
5. 4to Congreso Internacional de Bacteriología y Enfermedades Infecciosas, 16-18 de mayo, 2016, Estados Unidos. “Evaluation of an accelerated micro-method for the detection, identification and antimicrobial susceptibility of urogenital mycoplasmas”. Autor principal: **Rodríguez N.**
6. Congreso 80 Aniversario del Instituto de Medicina Tropical. IX Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. VI Congreso Nacional de Medicina Tropical. VI Seminario Internacional sobre la Infección por el VIH y el sida en Cuba. 2017. Cuba. - - - Evidencias de la infección por *Mycoplasma pneumoniae* en Cuba. Necesidad de una vigilancia activa. Presentación oral: **Rodríguez N.**

- Detección de resistencia a macrólidos en aislamientos cubanos de *Mycoplasma pneumoniae*.

Poster. Autora: **Rodríguez N.**

7. XXVIII Congreso ESCMID, 2018. España. *Mycoplasma pneumoniae* infections in Cuba.

Diagnosis and antimicrobial susceptibility of clinical isolates .ePoster. Autora principal:

**Rodríguez N.**

8. Conferencia Internacional “Resistencia a los antimicrobianos, del laboratorio a la clínica”,

Habana, Cuba. 26-27/09/2018. Resistencia Antimicrobiana en Micoplasmas: Consecuencias

Clínicas. Conferencista: **Rodríguez N.**

9. Simposio “Nuevos horizontes en el diagnóstico de micoplasmas en Cuba: a 10 años de la

introducción del MYCO WELL D-ONE”. 18 de enero 2019, La Habana, Cuba. Resultados de

los estudios de susceptibilidad utilizando el MYCO WELL DONE. Conferencista:

**Rodríguez N.**

10. Simposio “Advances in Immunology and Therapy of infectious diseases: From Bench to

Bed, 2nd Edition, Sexual Transmitted Diseases: An Integral Approach, 1st Edition” Habana,

Cuba. 29-31/10/19. First detection and characterization of macrolide-resistant *Mycoplasma*

*pneumoniae* strains in Cuba. Presentación oral: **Rodríguez N.**

## TESIS DEFENDIDAS Y TUTOREADAS

- ✓ **Tesis en opción al título de Licenciado en Microbiología:** “Determinación del perfil de susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos cubanos de *Ureaplasma* spp.”  
Autora: Brenda Barreto. Julio 2015. IPK. Cuba.
- ✓ **Tesis en opción al título de Licenciado en Microbiología:** “Evidencias de la importancia de *Mycoplasma pneumoniae* como patógeno de infecciones respiratorias en Cuba”. Autora: Aylin Cruz García. Julio 2016. IPK. Cuba.
- ✓ **Tesis en opción al título de Licenciado en Microbiología:** “Prevalencia de infecciones por *Mycoplasma pneumoniae* en Cuba, 2017: Implementación de un nuevo método de diagnóstico molecular”. Autora: Maigel Sánchez Marsilis. Julio 2018. IPK. Cuba.

## PREMIOS

- ✓ **Resultado Relevante Institucional 2020.** “Evidencias de infecciones por *Mycoplasma pneumoniae* en Cuba. Necesidad de una vigilancia epidemiológica activa”. Autora principal: Nadia Rodríguez.
- ✓ **Logro de la Academia de Ciencias de Cuba 2021.** “Evidencias de infecciones por *Mycoplasma pneumoniae* en Cuba. Necesidad de una vigilancia epidemiológica activa”. Autora principal: Nadia Rodríguez.

**PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DEL  
AUTOR NO RELACIONADAS  
CON TEMA DE LA TESIS**

**PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DEL AUTOR NO RELACIONADAS CON  
TEMA DE LA TESIS**

- **Rodríguez NP**, Zamora YM, Fernández CM, Parada MD, Duque de Estrada MM, Llanes RC, González LR. Detection of urogenital mycoplasmas in women with bacterial vaginosis. *Int J Infect Dis* 2004; 8 (Sup.1):150.
- Fernandez C, Latino MA, Zamora Y, **Rodríguez N**, Llanes R, Neve V. Diagnosis of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* during the pregnancy and possible complications. *Int J Infect Dis* 2004; 8 (Sup.1):106.
- Zamora YM, Parada MD, **Rodríguez NP**, Almanza CM, Duque de Estrada MM, Llanes RC, González LR, Fernández CM. Study of urogenital mycoplasmas in infertile women. *Int J Infect Dis* 2004; 8 (Sup.1):106.
- Rivera-Tapia JA, Centeno MT, Santellan MO, **Rodríguez NP**. Prevalencia de *Ureaplasma urealyticum* en mujeres. *Rev Mex Patol Clin* 2004; 51 (1): 33-36.
- Rivera- Tapia JA, **Rodríguez Preval N**. *Helicobacter pylori*, micoplasmas y patologías gástricas. *Salud Pública Méx* 2005; 47 (2): 105-106.
- Rivera- Tapia JA, **Rodríguez Preval N**. Micoplasmas y antibióticos. *Salud Pública Méx* 2006; 48(1): 1-2.
- Rivera–Tapia JA, **Rodríguez Preval N**. Possible role of mycoplasmas in pathogenesis of gastrointestinal diseases. *Rev Biomed* 2006; 17: 132- 139.
- Zamora Y, Fernández C, Rodríguez I, Obregón A, Rodríguez J, **Rodríguez N**. Método de la reacción en cadena de la polimerasa en la detección temprana de *Leptospira* spp. en hemocultivos de pacientes con sospecha de leptospirosis. *Rev Cubana Med Trop* 2006; 59(1).

- Rodríguez I, Fernández C, Obregón A, Zamora Y, Rodríguez J, **Rodríguez N**, Berdasquera D, Llop A. Confirmación microbiológica de 2 brotes emergentes de leptospirosis humana en Cuba. *Rev Cubana Med Trop* 2007; 59 (1).
- Fernández C, Zamora Y, **Rodríguez N**, Llanes R, Berdasquera D, Ortega L. Diagnóstico de *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Ureaplasma parvum* en pacientes con Vaginosis Bacteriana. *Rev Cubana Med Trop* 2007; 59 (2).
- **Rodríguez NM**, Fernández C, Rodríguez I, Berdasquera D, Rivera-Tapia JA. PCR-Múltiple para el diagnóstico de *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum*. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública* 2007; 24 (2): 152-56.
- Fernandez-Molina C, **Rodríguez-Preval N**, Rodriguez-Gonzalez I, Agnese-Latino M, Rivera-Tapia J, Ayala-Rodriguez I. Diagnóstico de *Mycoplasma genitalium* por amplificación de los genes MgPa y ARN ribosomal 16S. *Salud Pública Méx* 2008; 50 (5): 358-361.
- Rivera A, Cedillo L, Giono S, **Rodríguez N**. Biofilm formation by *Mycoplasma fermentans* on intrauterine devices. *Int J Med Med Sci* 2009; 1 (6): 267-271.
- Eduardo Echevarría, Carmen Fernández, **Nadia Rodríguez**, Islay Rodríguez, Yarelys Zamora. Detección de micoplasmas y ureaplasmas urogenitales en pacientes con síntomas uretrales. *Revista Investigaciones Medicoquirúrgicas* 2009; 1(1): p.102.
- Colectivo de autores. Manual de técnicas diagnósticas de las infecciones del tracto reproductivo. Ecimed: La Habana, 2009. (ISBN 978-959-212-386-1).
- **Rodríguez N**, Fernández C, Zamora Y, Verdasquera D, Rivera-Tapia J. Detection of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* in amniotic fluid: association with pregnancy outcomes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2011; 24(1):47-50.



- Rivera A, Giono S, Gonzalez M, **Rodríguez N**, Cedillo L. Antibacterial effect of *Morinda citrifolia* fruit juice against mycoplasmas. *Annals of Biological Research* 2011; 2 (3):491-497
- Fraga J, **Rodríguez N**, Fernández C, Mondeja B, Sariago I, Fernández-Calienes A, Rojas L. *Mycoplasma hominis* in Cuban *Trichomonas vaginalis* isolates: Association with parasite genetic polymorphism. *Experimental Parasitology* 2012; 393–398.
- Rivera-Tapia JA, Chávez-Bravo E, Lara-Sánchez N, Hernández-Aldana F, **Rodríguez-Preval N**. Actividad desoxirribonucleasa (ADNasa) en un aislamiento clínico de *Mycoplasma fermentans*. *Rev Latinoamer Patol Clin* 2012; 59 (4): 202-206.
- Mondeja Rodríguez BA, Fernández Molina C, Rodríguez González I, **Rodríguez Preval NM**, Martínez Romero MR, Mederos Cuervo LM. Aislamiento de *Mycoplasma* spp. a partir de pacientes cubanos VIH-positivos con síntomas respiratorios. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2013; 65(3): 381-387.
- Mondeja BA, Jensen JS, Rodríguez I, Morier LF, Kourí V, **Rodríguez N**, Fernández C. Isolation of *Mycoplasma genitalium* from patients with urogenital infections: first report from the Latin-American region. *New Microbe New Infect*. 2013; 1: 22–26
- Mondeja BA, Jensen JS, **Rodríguez N**, Capote M, Rodríguez I, Fernández C. Detección de *Mycoplasma genitalium* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa en muestras urogenitales de individuos cubanos sexualmente activos. *VacciMonitor* 2014; 23(1):17-23.
- Mondeja-Rodríguez BA, Jensen JS, **Rodríguez-Preval NM**, Rodríguez-Gonzalez I, Fernández-Molina C. Implementación de una Reacción en Cadena de la Polimerasa

- Cuantitativa para la detección de *Mycoplasma genitalium*. *VacciMonitor* 2014; 23(2):57-62.
- Rivera A, Cedillo L, Romero O, Gil C, **Rodríguez N**, Giono S. Mollicutes Isolates and their Relationship to Infertility in Women. *J Pure Appl Microbio* 2015; **9**(1): 119-123.
  - Mondeja BA, **Rodríguez NM**, Barroto B, Blanco O, Jensen JS. Antimicrobial Susceptibility Patterns of Recent Cuban *Mycoplasma genitalium* Isolates Determined by a Modified Cell-Culture-Based Method. *PLoS ONE* 2016; 11(9).
  - Brian Arturo Mondeja Rodríguez, **Nadia María Rodríguez Preval**, Ruxana Sardiñas Morales, Anya Arquez de Paz; Jorge Alexis Armenteros Quintana. Infección por *Mycoplasma genitalium* en neonatos ventilados con trastornos respiratorios. *BOLIPK*. 2017; 04:27.
  - Rivera A, Cedillo L, Perez J, Hernandez F, Romero O, **Rodríguez N**. Isolation of Enterobacteria and Spiroplasmas from *Apis mellifera*. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 2018; 6(3): 900-902.
  - Brian A Mondeja, **Nadia M Rodríguez**, Orestes Blanco, Carmen Fernández, Jørgen S Jensen. *Mycoplasma genitalium* infections in Cuba: surveillance of urogenital syndromes, 2014–2015. *International Journal of STD & AIDS* 2018; DOI: 10.1177/0956462418767186.
  - Mondeja BA, Jensen SJ, O Blanco, **Rodríguez NM**. Evaluation of a new accelerated commercial micro-method for the presumptive diagnosis of *Mycoplasma genitalium* infections. *International Journal of Infectious Diseases* 73S (2018) 3–398.

- Mondeja BA, Curi J, **Rodríguez NM**, O Blanco, Fernández C, Jensen SJ. Macrolide-resistant *Mycoplasma genitalium* infections in Cuban patients: an underestimated health problem. *BMC Infectious Diseases* (2018)18:601.
- Mondeja B, Alimañy E, Vila de Armas Y, **Rodríguez N**. *Mycoplasma pneumoniae* endophthalmitis in a Cuban pediatric patient. *SAGE Open Medical Case Reports* 2019; 7: 1–2.
- Marcela Gómez-Garzón, Gualberto Hernández-Yesid, Claudia Lorena Cruz-Hernández, Jhindy Tatiana Pérez-Lozada, **Nadia Rodríguez-Preval**, Lilian Torres-Tobar. Identificación de microorganismos vaginales en pacientes en trabajo de parto pretérmino. *Ginecol Obstet Mex.* 2019; 87(7):436-446.
- Rivera A, **Rodríguez-Preval N**, Giono-Cerezo S, Sanchez-Hernandez J. A. Preservation Evaluation of *Mycoplasma fermentans* in Different Conditions. *IJSciences* 2020; 9(02): 24-27.