



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Biociències
Departament de Genètica i Microbiologia



Universitat Autònoma
de Barcelona

Aportaciones moleculares al estudio de las infecciones
causadas por *Mycoplasma pneumoniae* y *Mycoplasma
genitalium*

2022

Memoria presentada por Belén Rivaya Sánchez para optar al grado de
Doctora en Microbiología por la Universitat Autònoma de Barcelona

Con la aprobación de las directoras de la tesis

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Gema Fernández Rivas', written over a horizontal line.

Dra. Gema Fernández Rivas

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Elena Jordana Lluch', written over a horizontal line.

Dra. Elena Jordana Lluch

Contenido

Agradecimientos	3
Resumen	5
Publicaciones que conforman esta tesis	10
Listado de abreviaturas	31
1. Introducción	33
1.1. <i>Género Mycoplasma</i>	33
1.1.1. Descubrimiento/historia.....	33
1.1.2. Clasificación taxonómica de <i>Mollicutes</i>	36
1.1.3. Características celulares	37
1.1.4. Factores de patogenicidad.....	43
1.2. <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	45
1.2.1. Características celulares	46
1.2.2. Epidemiología	49
1.2.3. Síndromes clínicos	55
1.3. <i>Mycoplasma genitalium</i>	62
1.3.1. Características celulares	63
1.3.2. Epidemiología	65
1.3.3. Síndromes clínicos	66
1.4. <i>Diagnóstico microbiológico de las infecciones causadas por M. pneumoniae y M. genitalium</i>	70
1.5. <i>Estudios epidemiológicos: técnicas de tipado molecular de cepas</i>	84
1.6. <i>Tratamiento de las infecciones causadas por M. pneumoniae y M. genitalium</i>	88
1.6.1. Susceptibilidad antibiótica y técnicas para la detección de resistencias	98
1.6.1.1. Resistencia a macrólidos.....	100
1.6.1.2. Resistencia a quinolonas.....	104
1.6.1.3. Técnica de pirosecuenciación para la detección de mutaciones asociadas a resistencia a macrólidos	107
1.6.1.4. Técnicas comerciales para la detección de resistencia a macrólidos en <i>M. genitalium</i>	116
2. Justificación y objetivos	122
2.1. <i>Justificación de la unidad temática de la tesis</i>	122
2.2. <i>Objetivos</i>	125
3. Resumen y discusión global de los resultados obtenidos	126
4. Conclusiones	143

5. Bibliografía	146
6. Anexos	167
6.1. <i>Comunicaciones en congresos</i>	167
6.2. <i>Publicaciones adicionales</i>	178

Agradecimientos

Durante los seis años que han pasado desde la matriculación de la tesis aquí escrita, han sido muchas personas con las que he tenido la suerte de compartir momentos, trabajo, vivencias y pica-picas varios. Pero la realidad es que el inicio de este trabajo no se remonta a 2016, sino a abril de 2013, cuando siendo aún una inexperta R1, nuestro jefe el Dr. Ausina me involucró en un proyecto FIS que acababan de conceder al servicio. Por este motivo, mi primera muestra de gratitud es hacia él, tristemente a título póstumo. Gracias por la confianza que depositaste en mí, desde aquel café mi primer día de residente en el que me preguntaste cuáles eran mis objetivos en Microbiología y por qué había escogido esta especialidad, y mis respuestas fueron todo menos lo que te podías esperar... en fin, creo que desde aquel momento nos caímos bien y no puedo más que dar gracias por todo lo que pude aprender de ti, que lideraste un servicio que se implicó totalmente en la clínica y consiguió un peso en el hospital que no muchos otros laboratorios tienen la suerte de tener. Por todo ello, gracias JEFE.

En segundo lugar, quiero darle las gracias a la Dra. Lurdes Matas, mi primera directora y tutora de tesis hasta su jubilación. Gracias por tu ayuda cuando me tocó relevar a Cèlia en la sección de Serología. A pesar de nuestra diferente personalidad, opinión e idioma, siempre hemos trabajado en sintonía. *Cuida't molt i que vagi tot bé!*

A continuación, mis directoras, Gema y Elena. Gracias por todo, sois las mejores. @Gema, tu “¡coño, yo también!” me salvó la vida y generó una conexión astur indestructible. Gracias por esas risas continuas, por hacerlo todo tan fácil (no *difículteiting*), ese humor asturbásico, los múltiples conocimientos transmitidos y esas “arandelas” que me siguen haciendo reír sola cada vez que me acuerdo. Me has apoyado y empujado cada segundo con esta tesis, ¡y no sabes cuánto te lo agradezco! ¡La Dra. Meneillos seguirá siendo la segunda de abordaje a pesar de estar en una nave espacial diferente! @Elena, has sido y eres un ejemplo y referencia para mí. Gracias por todo lo que me has enseñado, de hecho, la mayor parte de lo que sé de biología molecular lo aprendí de ti, y no pude tener mejor maestra. Gracias por ese espíritu científico que en tantos momentos me ha animado a seguir adelante con esto, y por esas risas que, tanto en pre y post-PCR, como en la salita, nos alegraban los días, tanto en Can Ruti, como en las fallas con olas en Benicarló, vuestra super boda en Menorca (“¡al puerto, al puerto!”) o Nottingham con su festival de la cerveza y sus pubs con Sunday roast. ¡Os esperamos pronto en Asturias!

Todo esto tampoco hubiese sido posible sin mis “Mojitos”, con nuestros momentos estelares en “carne picada” (CTRL+C-CTRL+V, pinsesa... que no, ¡limpieza!, veranos moleculares con chistes de Carl y asustando a todo el mundo desde nuestra caja de cartón, tildes “p’alante y p’atrás”, nochebuena entre panderetas y villancicos en Mataró y clases de sevillanas con caracol) ni el resto de las compañeras y compañeros de Micro de Can Ruti, con los que tantas cosas he compartido: guardias con parada en Digestivo que incluían chorizo premium de Caprabo, la mejor tortilla de patata o brevajes selectos, cafés postprandiales, pica-picas pre-covid, meriendas en la salita, bocatas de tamaño brazo, chocolates con churros en La Manchega, cenas de Navidad, conciertos de nuestro Alejandro, lecturas de meseta (“si nos dejaaaaaan...”), masajes de tobillo terapéuticos, ruti-bus al mejor barrio de BCN o conversaciones interminables intentando arreglar un mundo que no tiene reparación... Gracias a tod@s por hacer de Can Ruti mi segunda casa durante ocho años. ¡Se os echa de menos... y mucho!

Además de los compis del servicio, la “aglutinación” de los resis de servicios centrales creó ese grupo de “Adjuntillos” que también hizo que estando a 1000km nos sintiésemos como en casa, y que poco a poco ¡va aumentando con segundas generaciones! ¡Merçi, chiquill@s!

El que esta tesis haya podido ser realizada también ha sido gracias a todos los servicios y profesionales que estuvieron involucrados en los diferentes proyectos, tanto de *M. pneumoniae* como *M. genitalium*: Pediatría, Unidad de VIH y Ginecología y Obstetricia de Can Ruti, así como los ASSIR de Badalona y Mataró. Sin su colaboración, estos resultados no podrían ser hoy aquí expuestos. Por toda vuestra ayuda, gracias.

Otra mención especial es para grupo de *Mycoplasma* de Burdeos. Además de agradecerlos todos los conocimientos transmitidos, en especial a Chloé (mi mentora y coordinadora durante toda mi estancia), quiero agradecer al resto del equipo por acogerme como una más, a pesar de mis limitaciones con el francés (¡gracias, Brigitte, por esos momentos en español que me descansaban la mente!), de incluirme en las lecturas de horóscopo de las comidas y darme sabios consejos tanto turísticos como gastronómicos, que hicieron que la experiencia en vuestra ciudad como una bordelesa más fuese maravillosa. *Merçi beaucoup, belles!*

También tengo un agradecimiento especial para todos los que me están acompañando en esta nueva etapa vital que el COVID propició (porque, aunque parezca imposible verle un lado bueno, a nosotros nos trajo el retorno a nuestra tierra). Gracias a todo el equipazo de Micro del HUCA, tanto a superiores, adjuntos y residentes, como al personal técnico y administrativo. A pesar de incorporarme en un momento de nula socialización, me integrasteis y me hicisteis sentir como en casa desde el primer momento. Gracias, de corazón.

También quería agradecer a toda la familia, tanto a la de sangre como a la de adopción, su apoyo y cariño, ya que ha sido fundamental en muchos momentos y, sin ellos, esto no sería lo mismo.

Para finalizar, y ya que he empezado con un agradecimiento póstumo, quería acabar de la misma forma. Yo no estaría aquí y ahora si no hubiese sido por ti, mamá. Nos diste amor incondicional y fuiste la base de nuestra existencia y educación. Siempre confiaste en mí y tu consejo de “estudia lo que más te guste, porque quien está ahora a tu lado, si merece la pena, te esperará”, se cumplió a rajatabla... tanto, que desde hace 20 años está junto a mí y ha sido el pilar fundamental para que este trabajo salga adelante y todo en la vida sea mejor con él a mi lado. Gracias, Aitor, por TODO, durante estas dos décadas de nuestras vidas. Si comenzase a escribir todo lo que siento y te agradezco, ¡tendría material para una segunda tesis! Además de todo lo vivido en este tiempo, GRACIAS, en especial, porque juntos hemos llevado a cabo el mejor proyecto del mundo: nuestra pequeña Laia, que junto a ti me ha dado el empujón final necesario pasando unas cuantas horas de sus sueños de recién nacida en mi regazo mientras escribía esta tesis.

Resumen

La presente Tesis doctoral, con título “Aportaciones moleculares al estudio de las infecciones causadas por *Mycoplasma pneumoniae* y *Mycoplasma genitalium*”, se basa en el desarrollo y optimización de métodos moleculares para el estudio de resistencias antibióticas en las especies del género *Mycoplasma*.

Las bacterias de este género pertenecen a la clase *Mollicutes*, y son el grupo de microorganismos procariotas más pequeños de vida libre y capacidad de división autónoma. Una de sus principales características es la de carecer de pared celular, hecho que impide su visualización microscópica a través de la tinción de Gram, y que condiciona las terapias empleadas en su tratamiento, ya que muchos de los antibióticos disponibles, como son los betalactámicos o los glucopéptidos, basan su mecanismo de acción en la interrupción del proceso de síntesis de la pared bacteriana.

Su cultivo es extremadamente complejo y laborioso, quedando limitado a centros especializados. Esto hace que el diagnóstico por cultivo bacteriano no sea una opción viable para las patologías causadas por este género, teniendo que recurrir a técnicas alternativas tanto de diagnóstico directo, como la amplificación del genoma mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa), como indirecto por serología, basada en la detección de la respuesta inmune del hospedador frente a las diferentes infecciones. Asimismo, al no disponer de la cepa aislada no se pueden realizar estudios convencionales de sensibilidad antibiótica, por lo que el tratamiento a pautar es empírico en la mayoría de los casos.

Existen menos de 20 especies del género *Mycoplasma* aisladas en el ser humano, pero entre ellas hay dos que destacan por su gran importancia en patología humana: *Mycoplasma pneumoniae* y *Mycoplasma genitalium*.

Mycoplasma pneumoniae es un patógeno exclusivamente humano que provoca diferentes cuadros clínicos, siendo la neumonía la de mayor interés. Se estima que, a niveles endémicos, *M. pneumoniae* causa de un 4-8% de neumonías adquiridas en la comunidad (NAC). Este porcentaje se eleva hasta un 20-40% en los picos epidémicos en la población general, afectando mayoritariamente a niños, adolescentes o la tercera edad. No es despreciable tampoco su capacidad de producir otro tipo de manifestaciones a nivel extrarrespiratorio, implicando reacciones autoinmunes que pueden causar cuadros de elevada gravedad.

Su diagnóstico microbiológico ha sido y es generalmente serológico, lo que implica que no es inmediato, ya que el sistema inmune requiere que la infección lleve unos días de evolución para poder generar anticuerpos específicos frente al microorganismo en cuestión. Por este motivo, se han desarrollado métodos moleculares que permiten la detección del DNA del patógeno por PCR, mejorando la sensibilidad y la rapidez diagnóstica. Sin embargo, *M. pneumoniae* puede permanecer durante periodos prolongados de tiempo en la nasofaringe del hospedador una vez resuelta la infección (en forma de portador asintomático), por lo que la interpretación de los resultados puede ser compleja.

Existen también otras técnicas moleculares que permiten el tipado molecular de microorganismo, útiles en el estudio epidemiológico de las cepas circulantes durante los brotes cíclicos o en el caso de brotes focalizados en un colectivo o instituciones concretas (como pueden ser las escuelas, las instalaciones militares o los hospitales o centros sociosanitarios). Además, la realización de este tipo de estudios permite explicar la clásica aparición cíclica de casos, dado que los cambios observados en algunas proteínas del microorganismo hacen que los anticuerpos generados en una primera infección sean ineficientes para impedir reinfecciones posteriores.

Como hemos referido anteriormente, los micoplasmas carecen de pared celular, lo que hace que sean intrínsecamente resistentes a numerosos antimicrobianos. El tratamiento de primera línea para las infecciones causadas por *M. pneumoniae* son los macrólidos y ketólidos, como la azitromicina o la claritromicina, respectivamente. Entre los macrólidos, la azitromicina es preferible respecto a la eritromicina por su mejor tolerabilidad, posología y menor duración de tratamiento, y de hecho es el tratamiento de elección. Como alternativas, tenemos las quinolonas y tetraciclinas. Las quinolonas son bactericidas y de gran utilidad en pacientes adultos, dada su buena biodisponibilidad oral y su amplio espectro antibiótico, que permite cubrir de forma empírica muchos de los microorganismos causantes de infección respiratoria (micoplasmas, clamidias, neumococo, *Legionella* sp. o *Moraxella catarrhalis*). Sin embargo, en la población infantil están, a priori, contraindicadas, por su potencial toxicidad en los cartílagos en desarrollo. Del mismo modo, las tetraciclinas no están recomendadas en niños menores de 8 años por los daños que causan en el esmalte dentario en esta franja de edad.

Diversos estudios habían descrito la generación de cepas resistentes a macrólidos tras la exposición a estos antibióticos *in vitro*, pero no fue hasta principios de los años 2000 cuando se reportó en Japón la aparición de las primeras cepas resistentes a macrólidos *in vivo*. Desde ese momento, estas cepas se extendieron ampliamente por toda Asia, donde

encontramos regiones con tasas de resistencia cercanas al 100%, y en menor medida por América y Europa lo que puede suponer un problema importante a la hora de instaurar un tratamiento empírico. En 2014 se describió el primer caso de resistencia a macrólidos en nuestro país, siendo un caso importado por una paciente de origen chino.

La otra especie de gran interés por su patología en el ser humano es *Mycoplasma genitalium*. Esta bacteria es un patógeno de transmisión sexual directamente relacionado con cuadros de uretritis no gonocócica (UNG) y con mayor evidencia en casos de uretritis no producida por gonococo ni clamidia (UNGNC), en los que representa entre un 10-35% de casos en los grupos poblacionales de mayor riesgo, como son los hombres que mantienen relaciones sexuales con otros hombres (HSH) o aquellos pacientes que acuden a clínicas de salud sexual. No solo afecta al sexo masculino, sino que en mujeres está relacionado con cuadros de cervicitis, enfermedad inflamatoria pélvica, partos pretérmino y aborto.

A diferencia de *M. pneumoniae*, la serología tanto en *M. genitalium* como en el resto de micoplasma urogenitales no constituye una opción válida, ya que la ubicuidad de muchas de las especies hace que la interpretación de los títulos de anticuerpos sea compleja, y la existencia de estos (sin otra prueba complementaria positiva) no es significativa. Por este motivo, su diagnóstico queda casi exclusivamente relegado a las técnicas moleculares.

Tal como referíamos para *M. pneumoniae*, los macrólidos (azitromicina) han sido ampliamente utilizados como tratamiento de primera línea para las infecciones causadas por *M. genitalium*, con las quinolonas (moxifloxacino) como terapia de segunda línea. Sin embargo, con la gran capacidad de esta bacteria para adquirir resistencia a ambos grupos de antimicrobianos, la posibilidad de que los cuadros causados por *M. genitalium* pasen a ser infecciones de transmisión sexual (ITS) no tratables se plantea como un escenario plausible, cercano en el tiempo y preocupante a nivel mundial.

Como alternativa tenemos también la doxiciclina, una tetraciclina empleada en algunos casos pero que muestra una eficacia baja en la erradicación de las infecciones. Por este motivo, la pristinamicina se ha establecido como tratamiento de tercera línea para pacientes con fracaso terapéutico con macrólidos y quinolonas.

Otra de las opciones de manejo de estas infecciones es el tratamiento guiado por resistencias (*Resistance-guided Sequential Therapy* - RGST), descrito en Australia hace pocos años y que plantea un esquema de tratamiento guiado por la detección de la presencia de resistencias previa instauración de la terapia antimicrobiana.

En esta tesis se ha evaluado la utilidad de las técnicas moleculares en el estudio de *M. pneumoniae* y *M. genitalium*.

La primera parte de la tesis versa sobre la aportación de los métodos moleculares aplicados a *M. pneumoniae*, en el marco de un proyecto tipo FIS (Fondo de Investigación Sanitaria) del Ministerio de Economía y Competitividad, titulado “Nuevas aproximaciones moleculares al estudio epidemiológico, patogénico y diagnóstico de las infecciones respiratorias causadas por *Mycoplasma pneumoniae*” (PI12/02298). Este proyecto consistió en un estudio prospectivo transversal de cuatro años de duración para profundizar en el conocimiento de la epidemiología, patogenia y diagnóstico de las infecciones respiratorias adquiridas en la comunidad causadas por *M. pneumoniae* en niños y adultos en el área sanitaria del Barcelonés Norte de Cataluña.

La técnica de elección para el diagnóstico de *M. pneumoniae* durante muchos años y en la mayoría de los laboratorios clínicos ha sido la serología. Las técnicas de PCR en tiempo real son relativamente recientes y no están disponibles en todos los centros. En esta tesis, se evaluó la utilidad diagnóstica y el significado clínico de la detección de *M. pneumoniae* en muestras respiratorias por PCR en tiempo real, en relación con la detección de anticuerpos específicos por serología, método utilizado de forma habitual en el laboratorio. La concordancia entre ambos métodos diagnósticos fue del 76%, mostrando la PCR una sensibilidad del 55% y una especificidad del 92% respecto a la serología.

Otra de las aplicaciones de los métodos moleculares son los estudios epidemiológicos, que permiten la caracterización de las cepas circulantes en una región en un momento determinado. Por ello, se evaluó la utilidad del MLVA (*multiple locus of variable-number tandem-repeat analysis*) como método de tipado en *M. pneumoniae*, estudiando los genotipos circulantes en nuestra área sanitaria entre 2012 y 2016. Los genotipos más frecuentes correspondieron con el 4-5-6-2, 3-5-6-2 y 3-6-6-2, mismos genotipos que los descritos en diversas partes del planeta en franjas temporales similares.

Además de los estudios epidemiológicos, las técnicas moleculares tienen aplicación en la detección de genes bacterianos cuya presencia determina que la cepa sea resistente a determinados antimicrobianos. Por esta razón, se evaluó la detección de resistencia a macrólidos en *M. pneumoniae* por pirosecuenciación, para conocer la situación al respecto en nuestro medio y estudiar las implicaciones que tiene el hallazgo de una cepa resistente en la evolución clínica de los pacientes. Se encontraron mutaciones asociadas a resistencia a macrólidos en un 8% de los casos, todas ellas relacionadas con un tratamiento previo con esta clase de antibióticos. Además, en seis casos, la resistencia se generó por presión

antibiótica durante el propio tratamiento del episodio, ya que la muestra recogida de forma previa al inicio de la terapia no mostraba mutaciones, mientras que la muestra post-tratamiento correspondía con una cepa resistente. Ambas cepas correspondían a la misma infección, tal como se pudo demostrar mediante el estudio genotípico por MLVA.

La segunda parte de la tesis se centra en la aportación de los métodos moleculares al estudio de *Mycoplasma genitalium*, dada la escasa información disponible acerca de la epidemiología y resistencia antibiótica en nuestro país. En este caso, se evaluó la pirosecuenciación como método casero para la detección de resistencia a macrólidos en *M. genitalium*, adaptando la técnica previamente desarrollada para el estudio de *M. pneumoniae*. La prevalencia de resistencia a macrólidos en nuestra zona fue de un 23.1%, observando un ligero incremento durante los años de estudio.

En el contexto del proyecto anterior, comenzaron a comercializarse técnicas moleculares de un solo paso, que incluían la detección de *M. genitalium* junto al análisis de las principales mutaciones asociadas a resistencia a macrólidos. Por este motivo, se decidió evaluar la pirosecuenciación, como técnica casera de detección de resistencia a macrólidos, respecto al kit ResistancePlus® MG kit (Speedx, Sydney, NSW, Australia), así como la concordancia de este último con la PCR múltiple de 7 patógenos empleada en nuestro centro, Allplex STI-7 Assay (Seegene Inc., Seoul, Korea), para el diagnóstico de *M. genitalium*.

La concordancia entre la técnica casera y la técnica comercial en la detección de *M. genitalium* fue de un 87%, valor que aumentó hasta un 95,4% al comparar la capacidad de detección de resistencia a macrólidos.

De forma complementaria, se realizó el análisis por secuenciación de mutaciones asociadas a resistencia a quinolonas en un subgrupo de 100 muestras, revelando una prevalencia en nuestra zona de un 3% de cepas de *M. genitalium* resistentes a quinolonas. Todas las cepas detectadas portaban resistencia dual tanto a macrólidos como a quinolonas, lo que revela la importancia del seguimiento de *M. genitalium* para un manejo correcto de los pacientes.

A la luz de la información obtenida, la implantación de técnicas moleculares en la rutina asistencial, tanto para el diagnóstico como para el análisis de mutaciones asociadas a resistencia a macrólidos en *M. pneumoniae* y *M. genitalium*, supone una mejora de gran valor en el manejo de nuestros pacientes.

Publicaciones que conforman esta tesis

Artículo 1

Macrolide resistance and molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* infections during a 4 year period in Spain

Belén Rivaya, Elena Jordana-Lluch, Gema Fernández-Rivas, Sònia Molinos, Roi Campos, María Méndez-Hernández y Lurdes Matas

Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2020 Oct 1;75(10):2752-2759

Artículo 2

Detection and Prevalence of Macrolide and Fluoroquinolone Resistance in *Mycoplasma genitalium* in Badalona, Spain

Belén Rivaya, Chloé Le Roy, Elena Jordana-Lluch, Gema Fernández-Rivas, Cristina Casañ, Victoria González, Jun Hao Wang-Wang, Cécile Bébéar, Lurdes Matas and Sabine Pereyre

Antibiotics, 2022 Apr 5;11(4):485.

Artículo 1

Macrolide resistance and molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* infections during a 4 year period in Spain

Belén Rivaya, Elena Jordana-Lluch, Gema Fernández-Rivas, Sònia Molinos, Roi Campos, María Méndez-Hernández and Lurdes Matas

Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2020 Oct 1;75(10):2752-2759

Macrolide resistance and molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* infections during a 4 year period in Spain

Belén Rivaya ¹†, Elena Jordana-Lluch¹†‡, Gema Fernández-Rivas¹, Sònia Molinos¹, Roi Campos²§, María Méndez-Hernández² and Lurdes Matas^{1,3*}

¹Microbiology Department, Laboratori Clinic Metropolitana Nord, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Department of Genetics and Microbiology, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ²Paediatric Department, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; ³CIBER in Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Madrid, Spain

*Corresponding author. E-mail: lmatas.germanstrias@gencat.cat

†Belén Rivaya and Elena Jordana-Lluch contributed equally to this work.

‡Present address: Antibiotic Resistance and Pathogenicity of Bacterial Infections Group, Balearic Islands Health Research Institute (IdISBa), Palma de Mallorca, Spain.

§Present address: Great Ormond Street Hospital for Children NHS Foundation Trust, London, UK.

Received 20 December 2019; returned 17 March 2020; revised 21 April 2020; accepted 12 May 2020

Background: *Mycoplasma pneumoniae* (MP) causes community-acquired pneumonia affecting mainly children, and tends to produce cyclic outbreaks. The widespread use of macrolides is increasing resistance rates to these antibiotics. Molecular tools can help in diagnosis, typing and resistance detection, leading to better patient management.

Objectives: To assess the MP genotypes and resistance pattern circulating in our area while comparing serological and molecular diagnosis of MP.

Methods: Molecular and serological diagnosis of MP was performed in 821 samples collected in Badalona (Barcelona, Spain) from 2013 to 2017. Multiple locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) and macrolide resistance detection by pyrosequencing were performed in those cases positive by PCR. Presence of respiratory viruses and relevant clinical data were also recorded.

Results: MP was detected in 16.8% of cases by PCR, with an overall agreement with serology of 76%. Eleven different MLVA types were identified, with 4-5-7-2 (50.1%) and 3-5-6-2 (29.2%) being the most abundant, with the latter showing a seasonal increase during the study. A total of 8% of the strains harboured a point substitution associated with macrolide resistance, corresponding mainly to an A2063G 23S rRNA mutation and directly related to previous macrolide therapy. Analysis of respiratory viruses showed viral coinfections in most cases.

Conclusions: Serological and molecular tools combined could improve MP diagnosis and the analysis of its infection patterns. Macrolide resistance is associated with previous therapy. Given that MP pneumonia usually resolves spontaneously, it should be reconsidered whether antibiotic treatment is suitable for all cases.

Introduction

Mycoplasma pneumoniae (MP) is a prevalent respiratory pathogen that causes about 20%–40% of cases of community-acquired pneumonia (CAP) in children and young adults, with epidemic peaks at 3–7 year intervals worldwide.¹ Serology is the gold standard, but molecular techniques offer a rapid and reliable alternative for MP diagnosis and epidemiological surveillance. Molecular typing by P1 restriction fragment length polymorphism analysis

(RFLP)² has been substituted by methods with higher discriminatory power, such as multiple locus variable number tandem repeat analysis (MLVA),³ allowing more accurate outbreak analysis and epidemic strain monitoring worldwide.

Macrolides (MLs) are the first-line treatment, due to their low side effects and convenient administration. MLs inhibit protein synthesis by binding to domain V of 23S rRNA.⁴ Mutations in domain II or V of 23S rRNA or in L4 and L22 ribosomal proteins have been

© The Author(s) 2020. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

1 of 8

described to be involved in ML resistance (MLr) in other species.^{5,6} In MP, the MLr *in vivo* is mainly driven by specific mutations in the V domain of 23S rRNA gene, leading either to a high level resistance profile (mutations at positions 2063 or 2064) or to a low level MLr (transition at position 2067 or a transversion at position 2617).^{4,7-11} However, although no mutations in domain II could be linked to MLr, mutations in ribosomal proteins L4 and L22 have been found both *in vitro*⁴ and *in vivo*,⁹ although their real impact in MLr is still unclear, so further research should be performed.

As MP culture is mainly performed in reference centres, MLr determination by broth dilution tests¹¹ is not accessible to most clinical microbiology laboratories. Molecular techniques targeting the single-copy 23S rRNA gene (such as PCR followed by high resolution melting curve analysis,¹²⁻¹⁴ Sanger sequencing,¹⁵ RFLP⁸ or pyrosequencing analysis¹⁶⁻¹⁸) have been described. As a consequence of widespread ML use, resistance rates have risen from 40% in 2008 to 90%–100% in China recently.^{19,20} Concurrently, in Europe, rates vary from 1% in Slovenia to up to 26% in Italy.²¹⁻²⁶ Due to the increase in the prevalence of MLr observed recently and the lack of data in Spain, it is imperative to improve technical tools for detecting resistant strains without delay and to adjust the patients' therapy as necessary.

As there are no published data about the MP MLVA types circulating in our area, this study aimed to provide insights about the genotypes and yearly distribution found in Catalonia (Spain). Furthermore, the evaluation of the presence of single-base mutations in domain V of the 23S rRNA gene that provide MLr in our setting is described, in comparison with the results described in other countries. Additionally, the clinical performance of the molecular technique used for MP pneumonia diagnosis was compared with routine serological testing.

Materials and methods

Ethics, patients included, samples and collection

Written informed consent was obtained from patients' guardians. This study was approved by the Clinical Research Ethics Committee at Germans Trias i Pujol University Hospital ('Comitè Ètic de Investigació Clínica', CEIC). Samples collected included nasopharyngeal aspirates and sera. A total of 821 nasopharyngeal samples from 774 individuals were obtained between April 2013 and January 2017 in the Pediatric Emergency room at the University Hospital Germans Trias i Pujol (Badalona, Spain). Samples were divided into different groups: children (<18 years old) clinically diagnosed with CAP, household or school contacts from a diagnosed pneumonia case and healthy volunteer subjects. Clinical data were registered by the Pediatric Department, and microbiological results were also recorded at the Microbiology Department.

M. pneumoniae serological and molecular diagnosis

Detection of IgG or IgM antibodies from sera was performed by a particle-agglutination assay (Serodio[®]-MYCO II, Fujirebio Europe) either singly or in two samples separated by at least 21 days in order to demonstrate a seroconversion. A positive result with clinical significance was defined as antibody levels $\geq 1/160$ for single samples. For the molecular diagnosis, DNA was extracted from nasopharyngeal aspirates using the nucliSENS[®] easyMag[®] platform (bioMérieux, France). MP molecular diagnosis was performed using two different assays: during the first stage of the project, Real Time PCR Realcycter *M. pneumoniae*/Chlamydomphila pneumoniae (Progenie molecular, Spain) was employed, whereas Anyplex[®] 2 RB5 Detection (Seegene Inc., Korea) was used later on. Those samples in which MP DNA

was detected were further investigated for MLVA typing and MLr by pyrosequencing. Respiratory viruses were also tested for in all MP-positive samples, using three different methods: BinaxNOW[®] Influenza A&B and BinaxNOW[®] Respiratory Syncytial virus immunochromatographic assay (Abbott-Alere Healthcare, USA), direct immunofluorescence D³ Ultra8 DFA Respiratory virus Screening & Identification Kit (Quidel Corporation, USA), used until April 2014, and Anyplex II RV-16 Detection (Seegene Inc., Korea), used from May 2014, when Anyplex was integrated into our diagnosis routine for adults and also for children with negative immunochromatographic results.

MLVA typing

DNA from PCR-positive samples was typed using the culture-independent MLVA approach described by Dumke and Jacobs,²⁷ performing a nested PCR in order to increase the sensitivity. Products from the secondary PCR were analysed by high-resolution capillary electrophoresis (QIAxcel[®] Advanced System, Qiagen, Germany) and subsequently purified (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen). Purified PCR products were then Sanger sequenced and the number of repeats was found by uploading the FASTA file to the web resource Tandem Repeat Finder.²⁸ Only four out of the five loci (Mp13, Mp14, Mp15 and Mp16) initially described by Dégrange et al.³ were analysed due to the high variability found in locus Mp1, as described elsewhere.²⁹ The MLVA type is depicted as the number of repeats within the Mp13, Mp14, Mp15 and Mp16 loci, respectively, separated by a hyphen. Optimization of the protocol was performed using the DNA from *M. pneumoniae* M129, acquired from DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Germany).

Resistance detection by pyrosequencing

The pyrosequencing protocol was modified from Spuesens et al.^{16,17} Two different assays were performed in order to cover all known mutations (550 bp apart) conferring ML-resistant genotypes found *in vivo*: the first assay was able to detect single base mutations at positions 2063, 2064 and 2067, while the second detected the mutation at position 2617. The protocol described¹⁷ was modified by increasing the number of cycles to 45 for both primary and secondary PCR and by adding 2 μ L of template for the secondary PCR. The presence of the targeted DNA fragment was detected by high-resolution capillary electrophoresis (QIAxcel[®] Advanced System, Qiagen), obtaining an approximately 165 bp fragment. Immobilization of the biotinylated product and the pyrosequencing reaction were also performed following the protocol of Spuesens et al.¹⁶ with the following modifications: a total of 4 μ L of streptavidin beads and 26 μ L of H₂O per sample were used, and the plates were mixed for 10 min instead of 15 min. Pyrosequencing reactions and sequence analysis were also performed using the Pyromark[™]Q96MD sequencer (Biotage, Sweden) and associated software.

Statistical analysis

Qualitative and categorical data were summarized with number and percentage, and were compared using a χ^2 test. Statistical analyses were performed with the statistical free software PSpP (<http://www.gnu.org/software/pspp/>, last accessed April 2020). Statistical significance was accepted at $P < 0.05$.

Results

Molecular detection of *M. pneumoniae*

A total of 821 specimens (described in Table 1) were collected from 774 individuals, corresponding to children in 769 cases (766 patients with suspicion of pneumonia or relatives with pneumonia, and 3 healthy children) and adults in 52 cases (29 patients with a

Table 1. Classification of the patients and specimens included in this study

Samples tested for MP	Age group	Group of individuals	Number of samples tested	Positive MP detection (number)	Complementary data
821 specimens (774 individuals)	Children (<18 years old)	Children with suspicion of pneumonia or relatives with pneumonia	766 ^a	17.5% (134) ^a	131 patients 2 household contacts 1 classmate
		Healthy children	3	0.0% (0)	
	Adults	Adults with diagnosis of pneumonia or close relatives with pneumonia	29	13.8% (4)	2 patients 2 relatives
Healthy adults (volunteer healthcare professionals)		23	0.0% (0)		

^aFor one specimen where MP was detected by PCR, it was not possible to perform the MLVA typing due to insufficient DNA. Thus, the total number of specimens from children typed was 133.

pneumonia diagnosis or their household contacts, and 23 volunteer health professionals). A positive detection of MP was obtained in 138 (16.8%) specimens, corresponding to 127 individuals. One positive specimen was excluded from the study due to insufficient DNA; thus, the final count of positive specimens was 137 (16.7%, 3 by Progenie, 134 by Anyplex). Positive detections were mostly from children (133, 97.1%), with only 4 (2.9%) from adults (close relatives). The median age of children was 6.6 years and the highest proportion of positive samples was detected in children aged >5 years (53.3%, 73/137), followed by children aged between 1 and 5 years (36.4%, 50/137) and ≤1 year old (7.3%, 10/137) (Table 2). The majority of specimens were collected during the middle years of the project (2014 and 2015), and the positivity rates per year were as follows: 26% in 2013 (19/73), 19% in 2014 (49/258), 13.2% in 2015 (56/423) and 22.4% in 2016 (15/67), as depicted in Figure 1(a).

Performance of molecular detection in comparison with serological diagnosis

In parallel to PCR, serological diagnosis was also performed in 376 cases, including 105 patients with a positive MP detection by PCR and 271 with a negative MP result. Among the 105 MP PCR-positive subjects, serology results in the acute phase (first serum sample) were also positive (antibody levels ≥1/160) in 75 (71.4%) cases, whereas in the remaining 30 cases with negative serology (antibody levels <1/160), seroconversion was observed in 13 (43.3%) patients in convalescence phase (second serum sample), leading to 88 out of 105 patients (83.8%) with both positive serology and PCR, and an overall agreement between techniques of 76%. Among the 271 MP PCR-negative subjects, serology was also negative in 199 cases (73.4%). The remaining 72 cases showed a positive serology result in a single sample. Thus, sensitivity and specificity of the PCR compared with serology was 55% and 92%, respectively (Table 3).

M. pneumoniae MLVA typing

Eleven different MLVA types were identified; the most abundant was 4-5-7-2 (70/137, 50.1%), followed by 3-5-6-2 (40/137,

29.2%), 3-6-6-2 (11/137, 8%), 4-5-6-2 (4/137, 2.9%), 3-5-7-2 (3/137, 2.2%), 4-5-5-2 (2/137, 1.5%), 4-5-7-3 (2/137, 1.5%), 4-6-7-2 (2/137, 1.5%), 3-3-6-2 (1/137, 0.7%), 3-4-6-2 (1/137, 0.7%) and 3-4-7-2 (1/137, 0.7%). The proportions of the types varied widely between the years of the study (Figure 1b). Comparing the 2 years with higher numbers of positive cases (2014 and 2015, Figure 1a), the proportion of type 4-5-7-2 during those years was similar, while an increase of type 3-5-6-2 and a decrease of type 3-6-6-2 was observed from 2014 to 2015. Interestingly, the distribution of the types also varied depending on the season (Figure 1c), with genotype 4-5-7-2 mostly detected during summer (both 2014 and 2015) in contrast to type 3-5-6-2, which was more frequent from winter 2014 to spring 2015. Genotype 3-6-6-2 also showed a peak during spring 2014, whereas the other minority genotypes were detected in similar numbers among all seasons from spring 2013 to spring 2016.

The four positive specimens detected from adults had the same MLVA profile as the children, suggesting transmission of MP within the same household.

Twelve out of the 137 cases were reinfections after 1 or 2 months from the primary specimen. In 9 specimens, the MLVA type detected was the same as the initial sample; however, for 2 patients, the MLVA changed. In one case, the initial MLVA was 3-6-6-2 (March 2015) but the MLVA from the specimens obtained in April and May 2015 was 3-5-6-2. For the other case, the initial type was 3-5-6-2 (March 2016) whereas the specimen obtained on April 2016 was 3-5-7-2. Given that both isolates had only a single repeat change from the initial profile, the second detected specimen could be a variant of the first isolate.

Clinical findings

Several parameters such as chest radiography, axillary temperature, respiratory rate, presence of adenopathy, arthralgia and pleural effusion were recorded, and a statistical analysis was performed to determine if there was a relationship to the MLVA type. Results are shown in Table 2; however, none of the clinical symptoms evaluated was related to a specific MLVA type.

Table 2. Characteristics and clinical symptoms distributed by MLVA type identified

Characteristic or clinical symptoms	MLVA type				% (n) from total of positive specimens (N=137)	P value
	4-7-5-2 (N=70)	3-5-6-2 (N=40)	3-6-6-2 (N=11)	Other (N=16)		
Sex						
male (n)	58.6% (41)	52.5% (21)	45.5% (5)	56.3% (9)	55.5% (76)	0.834
female (n)	41.4% (29)	47.5% (19)	54.5% (6)	43.7% (7)	44.53% (61)	
Age group						
≤1 year (n)	5.7% (4)	5.0% (2)	0.0% (0)	25.0% (4)	7.3% (10)	0.252
1-5 years (n)	38.6% (27)	40.0% (16)	36.4% (4)	18.6% (3)	36.4% (50)	
>5 years (n)	51.4% (36)	52.5% (21)	63.6% (7)	56.2% (9)	53.3% (73)	
adult (n)	2.2% (3)	0.73% (1)	0.0% (0)	0.0% (0)	2.9% (4)	
Body temperature						
afebrile (n)	54.3% (38)	57.5% (23)	81.8% (9)	50.0% (8)	57.0% (78)	0.348
fever/slight fever (n)	45.7% (32)	42.5% (17)	18.2% (2)	50.0% (8)	43.0% (59)	
Respiratory rate						
eupnoea (n)	70% (49)	72.5% (29)	81.82% (9)	68.75% (11)	71.5% (98)	0.857
tachypnoea (n)	30% (21)	27.5% (11)	18.18% (2)	31.25% (5)	28.5% (39)	
Lung auscultation						
normal (n)	45.7% (32)	47.5% (19)	72.73% (8)	37.5% (6)	47.5% (65)	0.316
altered (n)	54.29% (38)	52.5% (21)	27.27% (3)	62.5% (10)	52.5% (72)	
Chest X-ray						
normal (n)	2.9% (2)	10.0% (4)	0.0% (0)	6.2% (1)	5.1% (7)	0.655
pathological (n)	80.0% (56)	72.5% (29)	90.91% (10)	81.3% (13)	78.8% (108)	
not performed (n)	17.1% (12)	17.5% (7)	9.1% (1)	12.5% (2)	16.1% (22)	
Adenopathies						
absent (n)	97.1% (68)	97.5% (39)	100.0% (11)	100.0% (16)	97.8% (134)	0.857
present (n)	2.9% (2)	2.5% (1)	0.0% (0)	0.0% (0)	2.2% (3)	
Arthralgia						
absent (n)	97.1% (68)	97.5% (39)	100.0% (11)	100.0% (16)	97.8% (134)	0.857
present (n)	2.9% (2)	2.5% (1)	0.0% (0)	0.0% (0)	2.2% (3)	
Stevens–Johnson syndrome						
absent (n)	98.57% (69)	97.5% (39)	100.0% (11)	100.0% (16)	98.5% (135)	0.873
present (n)	1.43% (1)	2.5% (1)	0.0% (0)	0.0% (0)	1.5% (2)	
Viral coinfection						
absent (n)	58.6% (41)	42.5% (17)	72.7% (8)	56.25% (9)	54.7% (75)	0.232
present (n)	41.4% (29)	57.5% (23)	27.3% (3)	43.75% (7)	45.3% (62)	

Viral infections were also evaluated in MP-positive patients. Respiratory viruses were found in 45.3% of patients (N=62), with two or more viruses detected in 12.4% of the cases. A total of 79 virus-positive samples were detected, listed in Table 4. The most frequently detected was *Rhinovirus* (37.9%, 30) followed by *Parainfluenza virus* (15.2%, 12) and Respiratory Syncytial Virus (13.9%, 11). The genotypes 4-5-7-2 and 3-5-6-2 were the most frequently co-infected with virus (P=0.033).

MLr detection

The MP PCR-positive samples were further screened for point mutations known to confer MLr, and they were detected in 11 samples (8%, 10 patients), showing four different types of mutation,

three of them in region 1 and one in region 2: A2063G (N=7), A2063T (N=1), A2064G (N=2) (region 1) and C2617A (N=1) (region 2).

Among the resistant strains, the most frequent MLVA type was 4-5-7-2 (N=8), followed by 3-5-6-2 (N=3), and all of them were detected between 2014 and 2016. All the resistant strains detected were linked to a previous treatment with MLs. In six cases, patients developed the resistance during the treatment of the studied episode, with a specimen before treatment being susceptible to MLs and having the same MLVA profile as the after-treatment and resistant specimen. In four cases, resistant strains were collected after ML treatment during the ongoing or a previous CAP episode. The last case was a patient whose brother previously had CAP caused by MP and was subsequently treated with MLs.

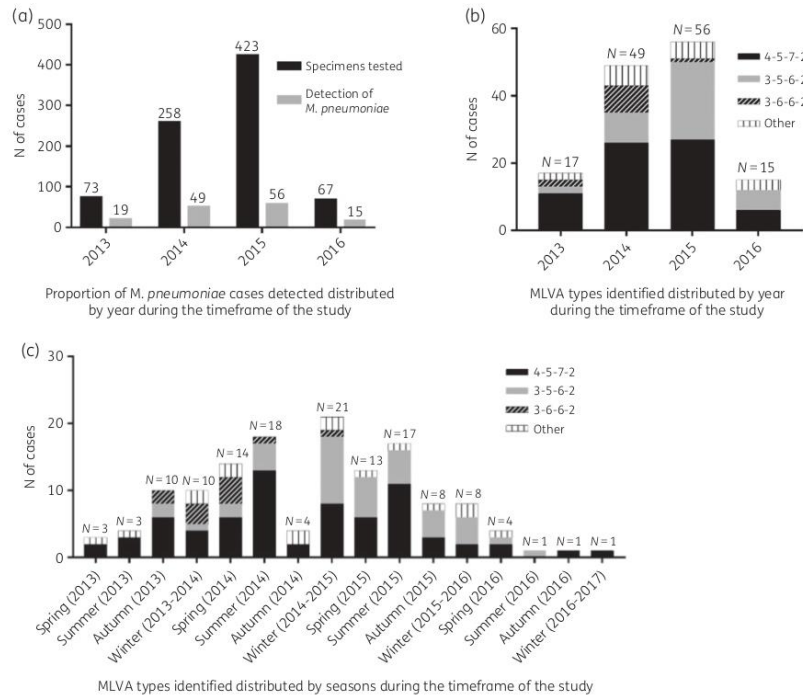


Figure 1. Molecular detection and typing of *M. pneumoniae*. (a) Detected cases of *M. pneumoniae* distributed by year. (b) MLVA types identified distributed by year. (c) MLVA types identified distributed by season during the time frame of the study.

Table 3. Performance of molecular diagnosis compared with serology for the detection of *Mycoplasma pneumoniae*

		Serology		Total
		Positive	Negative	
PCR	Positive	75/88 ^a	30/17 ^a	105
	Negative	72	199	271
Total		147/160 ^a	229/216 ^a	376
Sensitivity		51%/55% ^a		
Specificity		87%/92% ^a		
Overall agreement		73%/76% ^a		

^aPatients that showed seroconversion (second serology with a positive result). PCR performed from nasopharyngeal aspirates.

Discussion

M. pneumoniae is known to cause between 20% and 40%¹ of CAP in children and young adults, with increasing resistance to MLs,¹³⁻²⁰ which are the first-line treatment. Prevalence of MP CAP

in our region has not been widely studied yet, and, to the best of our knowledge, this is the first study to document the MLVA types circulating in our area as well as the MLr prevalence. During the study period, a total of 137 (16.7%) specimens were positive and could be further analysed for MLVA typing and MLr detection. The proportion of positive samples detected is similar to that in other European countries.^{21,30}

During our study, a higher number of positive cases was detected during 2014 and 2015 (Figure 1a), probably related to a higher number of specimens processed. In accordance with similar studies found in the literature,²¹ the highest proportion of positive cases was in children older than 5 years (N = 73).

Culturing MP is usually performed in reference centres. Given the prompt presence of IgM antibodies, especially in children, serological tests are the most often applied methods for MP diagnosis. Different techniques have been used, such as complement fixation tests, enzyme immunoassays or passive agglutination with latex or gelatin particles, which have been extensively reviewed.¹ Usually, two samples (from initial and convalescent phases) are required to demonstrate the seroconversion and to increase the diagnostic sensitivity, although some authors have found that using only an acute phase sample could lead to a diagnosis

Downloaded from https://academic.oup.com/jac/article-abstract/doi/10.1093/jac/dkaa256/5870410 by guest on 16 July 2020

Table 4. Virus detected^a distributed by MLVA type identified

Virus	MLVA type				Total
	4-7-5-2 (N=70)	3-5-6-2 (N=40)	3-6-6-2 (N=11)	other (N=16)	
Influenza virus	28.6% (2)	28.6% (2)	0.0% (0)	42.8% (3)	8.9% (7)
Metapneumovirus	0.0% (0)	0.0% (0)	0.0% (0)	100% (1)	1.3% (1)
Parainfluenza virus	66.7% (8)	25.0% (3)	0.0% (0)	8.3% (1)	15.2% (12)
Respiratory Syncytial Virus	27.3% (3)	36.3% (4)	18.2% (2)	18.2% (2)	13.9% (11)
Rhinovirus	53.3% (16)	36.7% (11)	3.3% (1)	6.7% (2)	37.9% (30)
Adenovirus	50.0% (5)	50.0% (5)	0.0% (0)	0.0% (0)	12.7% (10)
Bocavirus	0.0% (0)	50.0% (1)	50.0% (1)	0.0% (0)	2.5% (2)
Coronavirus	0.0% (0)	100% (2)	0.0% (0)	0.0% (0)	2.5% (2)
Enterovirus	50.0% (2)	0.0% (0)	25.0% (1)	25.0% (1)	5.1% (4)
Total	45.6% (36)	35.4% (28)	6.3% (5)	12.7% (10)	100% (79)

^aResults are shown as the percentage with virus detected (n).

in up to 50% of cases.^{31,32} In our comparison of serology and molecular methods, we found an overall agreement of 73% between both techniques during the acute phase (first serum sample positive, antibody titre $\geq 1/160$). After the seroconversion of 13 patients, the overall agreement increased to 76%. Discrepancies between these methods can be explained due to the nature of the techniques.³³⁻³⁵ Immunosuppressed patients or collecting the serology specimen too early during the acute phase could lead to false-negative results.³⁶ On the other hand, in the event of a previous MP infection, IgM can be detected for months or even years.^{34,35} Kim et al.³⁶ suggested to set the positivity cut-off to a titre $\geq 1/640$ for the diagnosis of acute-phase CAP. In our study, in 61 out of the 72 serology-positive-PCR-negative cases, their antibody titres were really close to the cut-off value (22 with a titre of 1/160 with no increase during the convalescent phase and 46 cases with a titre of 1/320), which could indicate previous contact with MP and thus be false positives for the current acute infection. On the other hand, 17 patients had negative serology but positive molecular detection of MP. It has been reported that MP can colonize the nasopharynx for a long time without any clinical manifestation. Meyer Sauter et al.³⁷ detected MP DNA in 48% of healthy children tested as controls during their study, and Nilsson et al.³³ were able to detect MP DNA for 7 weeks after the clinical symptoms, even though the patients were correctly treated with MLs. Further research would be necessary to clarify the impact of carriers in the community on infection transmission. Molecular techniques can be valuable tools for MP diagnosis, and further allow the study of epidemic clusters by performing molecular typing or the detection of resistance patterns. Thus, combining serological methods with molecular tools should improve MP diagnosis and avoid misinterpretation.

MLVA is a powerful genotyping tool that can be used to better distinguish among strains.³⁸ The genotypes 4-5-7-2 and 3-5-6-2 were the most abundant, as has been described in other geographic areas such as Europe,³⁹ the USA⁴⁰ and China.¹⁰ Furthermore, those genotypes were seasonal, with 4-5-7-2 mainly detected during summer whereas 3-5-6-2 was mainly circulating

during winter and spring. Minority genotypes were evenly distributed within seasons and the years of the study.

Clinical aspects in MP pneumonia can be subtle and shared with other viral or bacterial entities. However, some clinical findings or an altered X-ray test, showing only bilateral pneumonia (20% of cases), could help in its diagnosis.^{1,41} Thus, the most reliable diagnostic is direct or indirect pathogen detection. Respiratory viruses were also tested for in patients with a confirmed MP pneumonia. In most cases we detected multiple viral coinfections, which complicated distinguishing whether the observed clinical symptoms were due to the virus or MP. This has been observed before, as some studies have shown that different viruses, such as *Rhinovirus*, could be found in children without any symptoms;⁴² thus their detection should be taken into consideration with some caution. In our study, this virus was the most frequently detected. However, it must be kept in mind that infections with other viruses such as *Parainfluenza* or *Respiratory Syncytial Virus* could be related to the clinical symptoms shared with MP.

In our study, no correlation was found between the MLVA type and the different symptomatology, in contrast to what was described by Yan et al.,⁴³ where the MLVA was linked to the clinical outcome, although this group also found that some MLVA types, irrespective of their susceptibility profile, showed a higher risk of progression to severe MP pneumonia.

MLs are the first-line treatment for children with MP pneumonia in our country.⁴⁴ Fluoroquinolones and tetracyclines are generally avoided in this population due to their side effects,⁴⁵ although countries with high rates of ML-resistant strains (such as Japan) have approved tosylflouxacin or minocycline as second-line drugs for children with MP pneumonia who respond poorly to MLs.⁴⁶ Several studies reporting MLr have been published. The first resistant strains were detected in Asia and were linked to broad ML use,⁴⁷ with resistance rates that vary between 13% and 100% in China^{19,20,48-50} or Japan.^{8,51-53} Similarly, antibiotic pressure seems to be the cause of the high resistance rate detected in Italy (25.6%).²⁶ Lower resistance rates have been described in other European countries, such as 9.8% in France,¹³ 9.3% in England,²³ 1.2% in Germany²⁴ and 1% in Slovenia.²¹ Interestingly, no resistant strains were detected in northern countries, such as Sweden.²⁵

Eight percent of the strains tested had a point substitution in domain V of the 23S rRNA gene that conferred resistance to MLs. Interestingly, in 6 out of 11 patients, a shift to a resistant pattern was detected from the initial to the second sample collected for the clinical follow-up after ML treatment. It is important to highlight that one of the resistant cases was resistant only after two doses of MLs, as the treatment had to be interrupted due to an allergic event. MLVA typing confirmed that it was probably the same strain and not a reinfection with an already resistant strain. Given that the MLr found *in vivo* is mainly linked to point mutations in domain V of the 23S rRNA,^{4,5} only that region was analysed. However, the real impact on the MLr phenotype of mutation on L4 and L22 ribosomal proteins remains unclear,^{4,9} and it should be addressed with further studies.

The rising incidence of ML-resistant strains favoured by a previous ML treatment is a significant finding. Interestingly, symptom clearance was observed in all ML-resistant CAP cases even after maintaining ML as antibiotic therapy.

This study had several limitations. First, sera and nasopharyngeal aspirate were simultaneously collected for MP serological and molecular diagnosis, respectively. Thus, when the CAP was suspected to be caused by a virus, there were no sera available to perform a serological diagnosis of MP, which would have given a more accurate comparison between the two techniques. Secondly, even though the number of specimens investigated was high ($N=821$), the final number of specimens positive for MP was relatively small for statistical purposes ($N=137$). Thirdly, this study only covers a small area of Spain. It would be interesting to perform a multi-centre study to include several regions of our country in order to corroborate our findings, preferably during an extended period to determine the occurrence of infection peaks in our area and to confirm the distribution of the observed MLVA types.

In conclusion, we have described the first evaluation of *M. pneumoniae* MLVA types circulating in our area. The most abundant types found were 4-5-7-2 and 3-5-6-2, with an MLr rate of 8%. Given that the clinical course of CAP usually resolves spontaneously, and MLs are extensively employed in children, it should be reconsidered whether the treatment is suitable in all cases, as it may unnecessarily increase MLr.

Acknowledgements

We thank Dr Elisa Martró for helping with the research project design and serology, and molecular biology technicians for their collaboration. Subsets of this work have been presented at the European Congresses of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) in the years 2015 (P1150 and EV0883), 2016 (P0779) and 2017 (P15549).

Funding

This work was supported by a Health Research Funding—Carlos III Health Institute (FIS-ISCIII) grant (PI12/02298). The funding body had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

Transparency declarations

None to declare.

References

- Atkinson TP, Balish MF, Waites KB. Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *FEMS Microbiol Rev* 2008; **32**: 956–73.
- Cousin-Allery A, Charron A, de Barbeyrac B et al. Molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* strains by PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. Application to French and Danish isolates. *Epidemiol Infect* 2000; **124**: 103–11.
- Dégrange S, Cazanave C, Charron A et al. Development of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2009; **47**: 914–23.
- Pereyre S, Guyot C, Renaudin H et al. In vitro selection and characterization of resistance to macrolides and related antibiotics in *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 460–5.
- Davies TA, Dewasse BE, Jacobs MR et al. In vitro development of resistance to telithromycin (HMR 3647), four macrolides, dindamycin, and pristinamycin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 414–7.
- Prunier AL, Malbrun B, Tande D et al. Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* with ribosomal mutations conferring resistance to macrolides. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 3054–6.
- Pereyre S, Gonzalez P, De Barbeyrac B et al. Mutations in 23S rRNA account for intrinsic resistance to macrolides in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma fermentans* and for acquired resistance to macrolides in *M. hominis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 3142–50.
- Matsuoka M, Narita M, Okazaki N et al. Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 4624–30.
- Liu X, Jiang Y, Chen X et al. Drug resistance mechanisms of *Mycoplasma pneumoniae* to macrolide antibiotics. *Biomed Res Int* 2014; **2014**: 320801.
- Zhao F, Li J, Liu J et al. Antimicrobial susceptibility and molecular characteristics of *Mycoplasma pneumoniae* isolates across different regions of China. *Antimicrob Resist Infect Control* 2019; **8**: 143.
- Lucier TS, Heitzman K, Liu SK et al. Transition mutations in the 23S rRNA of erythromycin-resistant isolates of *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**: 2770–3.
- Wolff BJ, Thacker WL, Schwartz SB et al. Detection of macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* by real-time PCR and high-resolution melt analysis. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 3542–9.
- Peuchant O, Menard A, Renaudin H et al. Increased macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* in France directly detected in clinical specimens by real-time PCR and melting curve analysis. *J Antimicrob Chemother* 2009; **64**: 52–8.
- Li X, Atkinson TP, Hagood J et al. Emerging macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* in children: detection and characterization of resistant isolates. *Pediatr Infect Dis J* 2009; **28**: 693–6.
- Yoo SJ, Kim HB, Choi SH et al. Differences in the frequency of 23S rRNA gene mutations in *Mycoplasma pneumoniae* between children and adults with community-acquired pneumonia: clinical impact of mutations conferring macrolide resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 6393–6.
- Spuesens EB, Hoogenboezem T, Sluijter M et al. Macrolide resistance determination and molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* by pyrosequencing. *J Microbiol Methods* 2010; **82**: 214–22.
- Spuesens EB, Meijer A, Bierschenk D et al. Macrolide resistance determination and molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory specimens collected between 1997 and 2008 in The Netherlands. *J Clin Microbiol* 2012; **50**: 1999–2004.
- Chan KH, To KK, Chan BW et al. Comparison of pyrosequencing, Sanger sequencing, and melting curve analysis for detection of low-frequency

- macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* quaspecies in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2013; **51**: 2592–8.
- 19 Zhou Z, Li X, Chen X et al. Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in adults in Zhejiang, China. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 1048–51.
- 20 Liu Y, Ye X, Zhang H et al. Characterization of macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* isolated from children in Shanghai, China. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; **67**: 355–8.
- 21 Kogaj R, Mrvic T, Praprotnik M et al. Prevalence, genotyping and macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* among isolates of patients with respiratory tract infections, Central Slovenia, 2006 to 2014. *Euro Surveill* 2015; **20**: pii=30018.
- 22 Pereyre S, Touati A, Petitjean-Lecherbonnier J et al. The increased incidence of *Mycoplasma pneumoniae* in France in 2011 was polyclonal, mainly involving *M. pneumoniae* type 1 strains. *Clin Microbiol Infect* 2013; **19**: E212–7.
- 23 Brown RJ, Macfarlane-Smith L, Phillips S et al. Detection of macrolide resistant *Mycoplasma pneumoniae* in England, September 2014 to September 2015. *Euro Surveill* 2015; **20**: 30078.
- 24 Dumke R, von Baum H, Luck PC et al. Occurrence of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains in Germany. *Clin Microbiol Infect* 2010; **16**: 613–6.
- 25 Gullsbj K, Bondeson K. No detection of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* from Swedish patients, 1996–2013. *Infect Ecol Epidemiol* 2016; **6**: 31374.
- 26 Chironna M, Sallustio A, Esposito S et al. Emergence of macrolide-resistant strains during an outbreak of *Mycoplasma pneumoniae* infections in children. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 734–7.
- 27 Dumke R, Jacobs E. Culture-independent multi-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Microbiol Methods* 2011; **86**: 393–6.
- 28 Benson G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 1999; **27**: 573–80.
- 29 Diaz MH, Winchell JM. The evolution of advanced molecular diagnostics for the detection and characterization of *Mycoplasma pneumoniae*. *Front Microbiol* 2016; **7**: 232.
- 30 Meyer Sauter PM, Bleisch B, Voit A et al. Survey of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in children with community-acquired pneumonia in Switzerland. *Swiss Med Wkly* 2014; **144**: w14041.
- 31 Talkington DF, Shott S, Fallon MT et al. Analysis of eight commercial enzyme immunoassay tests for detection of antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* in human serum. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; **11**: 862–7.
- 32 Matos L, Dominguez J, De Ory F et al. Evaluation of Meridian ImmunoCard *Mycoplasma* test for the detection of *Mycoplasma pneumoniae*-specific IgM in paediatric patients. *Scand J Infect Dis* 1998; **30**: 289–93.
- 33 Nilsson AC, Bjorkman P, Persson K. Polymerase chain reaction is superior to serology for the diagnosis of acute *Mycoplasma pneumoniae* infection and reveals a high rate of persistent infection. *BMC Microbiol* 2008; **8**: 93.
- 34 Copete AR, Vera C, Herrera M et al. *Mycoplasma pneumoniae* in children with and without community-acquired pneumonia. What do PCR and serology say? *Pediatr Infect Dis J* 2020; doi:10.1097/INF.0000000000002636.
- 35 Wang L, Feng Z, Zhao M et al. A comparison study between GeXP-based multiplex-PCR and serology assay for *Mycoplasma pneumoniae* detection in children with community acquired pneumonia. *BMC Infect Dis* 2017; **17**: 518.
- 36 Kim NH, Lee JA, Eun BW et al. Comparison of polymerase chain reaction and the indirect particle agglutination antibody test for the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children during two outbreaks. *Pediatr Infect Dis J* 2007; **26**: 897–903.
- 37 Meyer Sauter PM, Krautter S, Ambroggio L et al. Improved diagnostics help to identify clinical features and biomarkers that predict *Mycoplasma pneumoniae* community-acquired pneumonia in children. *Clin Infect Dis* 2019; doi:10.1093/cid/ciz1059.
- 38 Benitez AJ, Diaz MH, Wolff BJ et al. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis of *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates from 1962 to the present: a retrospective study. *J Clin Microbiol* 2012; **50**: 3620–6.
- 39 Sun H, Xue G, Yan C et al. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis of *Mycoplasma pneumoniae* clinical specimens and proposal for amendment of MLVA nomenclature. *PLoS One* 2013; **8**: e64607.
- 40 Diaz MH, Benitez AJ, Winchell JM. Investigations of *Mycoplasma pneumoniae* infections in the United States: trends in molecular typing and macrolide resistance from 2006 to 2013. *J Clin Microbiol* 2015; **53**: 124–30.
- 41 Waites KB, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2004; **17**: 697–728.
- 42 El Kholy AA, Mostafa NA, Ali AA et al. The use of multiplex PCR for the diagnosis of viral severe acute respiratory infection in children: a high rate of co-detection during the winter season. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016; **35**: 1607–13.
- 43 Yan C, Xue G, Zhao H et al. Molecular and clinical characteristics of severe *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children. *Pediatr Pulmonol* 2019; **54**: 1012–21.
- 44 Moreno-Perez D, Andres Martin A, Tagarro Garcia A et al. Community acquired pneumonia in children: treatment of complicated cases and risk patients. Consensus statement by the Spanish Society of Paediatric Infectious Diseases (SEIP) and the Spanish Society of Paediatric Chest Diseases (SENP). *An Pediatr (Barc)* 2015; **83**: 217 e1–11.
- 45 Lee H, Yun KW, Lee HJ, Choi EH. Antimicrobial therapy of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2018; **16**: 23–34.
- 46 Mikasa K, Aoki N, Aoki Y et al. JAID/JSC Guidelines for the Treatment of Respiratory Infectious Diseases: the Japanese Association for Infectious Diseases/Japanese Society of Chemotherapy—The JAID/JSC Guide to Clinical Management of Infectious Disease/Guideline-preparing Committee Respiratory Infectious Disease WG. *J Infect Chemother* 2016; **22**: S1–65.
- 47 Bèbèar C, Pereyre S, Peuchant O. *Mycoplasma pneumoniae*: susceptibility and resistance to antibiotics. *Future Microbiol* 2011; **6**: 423–31.
- 48 Zhao F, Liu G, Wu J et al. Surveillance of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in Beijing, China, from 2008 to 2012. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 1521–3.
- 49 Ho PL, Law PY, Chan BW et al. 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* 2015; **53**: 3560–4.
- 50 Zhao F, Liu J, Shi W et al. Antimicrobial susceptibility and genotyping of *Mycoplasma pneumoniae* isolates in Beijing, China, from 2014 to 2016. *Antimicrob Resist Infect Control* 2019; **8**: 18.
- 51 Matsuda K, Narita M, Sera N et al. Gene and cytokine profile analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* infection in Fukuoka. *BMC Infect Dis* 2013; **13**: 591.
- 52 Okada T, Morozumi M, Tajima T et al. Rapid effectiveness of minocycline or doxycycline against macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* infection in a 2011 outbreak among Japanese children. *Clin Infect Dis* 2012; **55**: 1642–9.
- 53 Tanaka T, Oishi T, Miyata I et al. Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* infection, Japan, 2008–2015. *Emerg Infect Dis* 2017; **23**: 1703–6.

Artículo 2

Detection and Prevalence of Macrolide and Fluoroquinolone Resistance in *Mycoplasma genitalium* in Badalona, Spain

Belén Rivaya, Chloé Le Roy, Elena Jordana-Lluch, Gema Fernández-Rivas, Cristina Casañ, Victoria González, Jun Hao Wang-Wang, Cécile Bébéar, Lurdes Matas and Sabine Pereyre

Antibiotics, 2022 Apr 5;11(4):485.

Article

Detection and Prevalence of Macrolide and Fluoroquinolone Resistance in *Mycoplasma genitalium* in Badalona, Spain

Belén Rivaya ^{1,2,†}, Chloé Le Roy ³, Elena Jordana-Lluch ^{1,2,4,‡}, Gema Fernández-Rivas ^{1,2,*}, Cristina Casañ ^{1,2}, Victoria González ^{1,2,4,5,6}, Jun Hao Wang-Wang ^{1,2}, Cécile Bébéar ^{3,7}, Lurdes Matas ^{1,2,6} and Sabine Pereyre ^{3,7}

¹ Microbiology Department, Laboratori Clinic Metropolitana Nord, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Ctra. Del Canyet, S/N, 08916 Badalona, Spain; belen.rivaya@sespa.es (B.R.); elena.jordana@ssib.es (E.J.-L.); ccasan.germanstrias@gencat.cat (C.C.); vgsoler@iconcologia.net (V.G.); jhwang.germanstrias@gencat.cat (J.H.W.-W.); lurdesmatasa@gmail.com (L.M.)

² Department of Genetics and Microbiology, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain

³ UMR 5234 Fundamental Microbiology and Pathogenicity, University of Bordeaux, CNRS, F-33000 Bordeaux, France; chloe.le-roy@u-bordeaux.fr (C.L.R.); cecile.bebear@u-bordeaux.fr (C.B.); sabine.pereyre@u-bordeaux.fr (S.P.)

⁴ Institute for Health Science Research Germans Trias i Pujol (IGTP), Ctra. Del Canyet, S/N, 08916 Badalona, Spain

⁵ Center for Epidemiological Studies on HIV/AIDS and STI of Catalonia (CEEISCAT), Generalitat de Catalunya, Ctra, Del Canyet, S/N, 08916 Badalona, Spain

⁶ CIBER in Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Avda. Monforte de Lemos, 3-5, 28029 Madrid, Spain

⁷ Bacteriology Department, National Reference Centre for Bacterial Sexually Transmitted Infections, CHU Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

* Correspondence: gfernandezr.germanstrias@gencat.cat

† Present address: Microbiology Department, Hospital Universitario Central de Asturias, 33011 Oviedo, Spain.

‡ Present address: Antibiotic Resistance and Pathogenicity of Bacterial Infections Group, Balearic Islands Health Research Institute (IdISBa), 07120 Palma de Mallorca, Spain.



Citation: Rivaya, B.; Le Roy, C.; Jordana-Lluch, E.; Fernández-Rivas, G.; Casañ, C.; González, V.; Wang-Wang, J.H.; Bébéar, C.; Matas, L.; Pereyre, S. Detection and Prevalence of Macrolide and Fluoroquinolone Resistance in *Mycoplasma genitalium* in Badalona, Spain. *Antibiotics* **2022**, *11*, 485. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040485>

Academic Editor: Corinna Kehrenberg

Received: 9 March 2022

Accepted: 1 April 2022

Published: 5 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Macrolide and fluoroquinolone resistance (MLr/FQr) in *Mycoplasma genitalium* (MG) infections is concerning worldwide. Current guidelines recommend performing MLr detection in MG-positive cases to adjust antimicrobial therapy. We aimed to evaluate the usefulness of PCR followed by pyrosequencing for MLr detection in comparison with a one-step commercial assay and to assess the prevalence of MLr and FQr in Badalona, Spain. A total of 415 MG-positive samples by Allplex STI-7 (Seegene) were analyzed for MLr detection by pyrosequencing. From those, 179 samples were further analyzed for MG and MLr by ResistancePlus[®] MG kit (SpeeDx) and 100 of them also for fluoroquinolone resistance (FQr) by sequencing the *parC* gene. Regarding MG detection, Allplex and Resistance Plus[®] showed an overall agreement of 87%, but this value rose to 95.4% if we compare them for MLr detection. Prevalence of MLr was 23.1% in Badalona, but this rate increased to 73.7% in the HIV-positive patients cohort. FQr detection showed 3% of resistant strains. Pyrosequencing is a convenient and cheap technique for MLr detection, but one-step tools should be considered in high-throughput laboratories. Despite the fact that MLr remained moderate and FQr was low in our study, simultaneous MG and MLr detection would improve patient's management applying resistance-guided treatment strategies.

Keywords: *Mycoplasma genitalium*; macrolide; fluoroquinolone; resistance; Spain

1. Introduction

Mycoplasma genitalium (MG) is an important sexually transmitted pathogen responsible for 15–20% of nongonococcal urethritis (NGU) in men [1] and cervicitis, pelvic inflammatory disease, preterm birth, and abortion in women [2]. MG is a fastidious microorganism that is difficult to grow from clinical samples and cellular culture is generally limited to reference

laboratories [3]. For this reason, molecular detection is the most widely used method for routine diagnosis of MG infection.

MG lacks a cell wall, being intrinsically resistant to beta-lactam antibiotics. Macrolides (ML) have been extensively used worldwide as a first-line treatment, with quinolones as second-line therapy. However, given the high capacity of this microorganism for acquiring antibiotic resistance to both groups, MG becoming an untreatable sexually transmitted infection (STI) is a plausible and close scenario. European guidelines recommend an extended ML regimen to avoid macrolide resistance (MLr) acquisition in susceptible strains [4]. The fourth-generation fluoroquinolone moxifloxacin is recommended as a second option if the strain is resistant to macrolides [4]. Furthermore, treatment failures with both therapies have already been reported—given by dual-resistant strains [5,6]. Alternatively, doxycycline has also been used but with poor efficacy [7]. For this reason, pristinamycin has been established as the primary third-line treatment for patients with ML or fluoroquinolone treatment failure [4].

Therefore, according to current guidelines in STI, MG detection in symptomatic patients and subsequent MLr studies on positive cases should be performed to adjust antimicrobial therapy when ML resistance patterns are detected [4].

Macrolide resistance is caused by point mutations in region V of the 23S rRNA gene at positions 2058, 2059 or 2062 (*E. coli* numbering). These mutations can be detected by in-house techniques using a two-step approach performing MG detection first and analyzing afterwards MLr presence in MG-positive cases [8,9]. Recently available commercial kits can also be used [10], with many of them able to detect MG and MLr patterns in a single step. Similarly, fluoroquinolone resistance (FQR) is mainly caused by mutations in genes *parC* or *gyrA* [11] and detecting these patterns when MLr is detected or especially after moxifloxacin treatment failure could be an interesting option to reserve third-line antimicrobials for selected patients. Quinolone resistance-determining regions (QRDR) can be studied by Sanger sequencing [12] or by new commercial assays authorized only for research purposes [13,14].

Limited data are available regarding MG macrolide and fluoroquinolone resistance in Spain [15–18]. The aim of this study was to evaluate pyrosequencing as an adequate in-house technique for detecting MG MLr in our two-step routine, by comparing it to a commercial one-step assay and to assess the prevalence of macrolide and fluoroquinolone resistance in Badalona, Spain.

2. Results

2.1. Demographic Data and Clinical Findings

A total of 415 MG-positive specimens detected by Allplex STI-7 assay (Seegene Inc., Seoul, Korea) from 407 individuals were collected between 2016 and 2018 from people who required STI diagnosis, being females in 75.9% of cases ($n = 309$) and males in 24.1% ($n = 98$). The mean age of the studied population was 26.2 years (ranging from 16 to 68).

The highest number of positive results was detected in patients up to 25 years-old ($n = 199$, 47.95%), followed by patients from 26 to 40 years-old ($n = 158$, 38.07%) and older than 40 years ($n = 58$, 13.98%). More details about the samples analyzed and their origins can be found in Table 1.

Information regarding clinical findings was registered by clinicians during the prospective part of study. Epidemiological information, medical records about symptomatology, or reason for seeking a STI test was obtained for 136 out of 181 patients included, showing that the most common cause was a previous intercourse with a STI-positive patient, followed by urethritis and leukorrhea, as shown in Figure 1. More detailed information about epidemiological data and clinical findings is presented in Table 2.

Table 1. Samples and origin.

Origin	Sample Type				Total
	Endocervical Swab	Urine	Rectal Swab	Urethral Swab	
ASSIR *	291	73	1	6	371
HIV Unit	0	18	17	2	37
Gynecology & Obstetrics	7	0	0	0	7
Total (n)	298	91	18	8	415
Total (%)	71.8	21.9	4.3	1.9	100.0

* ASSIR: Sexual Reproductive Health Centers.

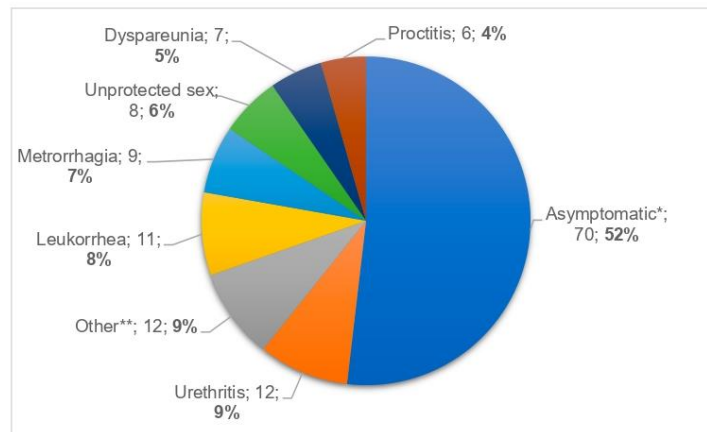


Figure 1. Symptoms and signs of patients included during the prospective phase of the study (Symptom, n, %). * Asymptomatic section includes STI contacts and patients with previous unprotected sex. ** Other: dysuria (n = 4), pruritus (n = 4), infertility (n = 2), test of cure (n = 1), amenorrhea (n = 1).

Focusing on risk factors for a MG infection, our cohort included 38 known HIV-positive males, including 94.7% (n = 36) men who have sex with men (MSM). Most of them were asymptomatic (63.2%, n = 24) and, among those with symptoms, proctitis (15.8%, n = 6), urethritis (13.2%, n = 5), or dysuria (7.9%, n = 3) were the most prevalent. Remarkably, in the HIV-positive group, MG was the only pathogen detected in almost half of the cases (n = 17, 44.7%).

Coinfections with other STI agents were detected, such as *Chlamydia trachomatis* (n = 1, 2.6%), *Neisseria gonorrhoeae* (n = 3, 7.9%), and *Treponema pallidum* (n = 6, 15.8%, one case jointly with *N. gonorrhoeae*). Other microorganisms such as *Ureaplasma* spp. or *M. hominis* were found in 31.6% of patients but were not considered because of their uncertain pathogenic role.

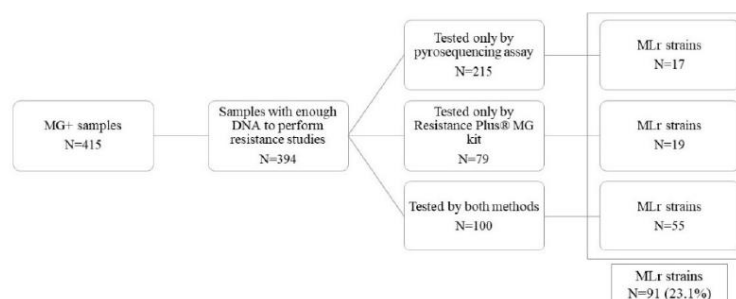
2.2. Detection of Macrolide and Fluoroquinolone Resistance

Among the 415 MG-positive samples detected by Allplex STI-7, 21 contained insufficient DNA to perform the resistance study, leaving a total of 394 specimens. Macrolide resistance analysis was performed by two different methods: pyrosequencing, ResistancePlus® MG kit, or by both methods. A subset of 100 samples was analyzed by both methods, whereas additional 215 samples were processed by pyrosequencing only and 79 more by ResistancePlus® MG kit only. The prevalence of macrolide resistance was 23.1%, with a total of 91 samples harboring macrolide resistance-associated mutations. More details are shown in Figure 2.

Table 2. Epidemiological data and clinical findings of MG infections of 136 patients included in the prospective phase of the study.

	Women (n = 83)	MSW (n = 17)	MSM (n = 36)
Mean age (range)	27.5 (16–56)	30.3 (20–44)	36.7 (24–55)
HIV+ (n, %)	-	2 (5.3%)	36 (94.7%)
Specimens (n, %)			
Endocervical swab	67 (80.7%)	-	-
Urine	16 (19.3%)	14 (82.3%)	17 (47.2%)
Urethral swab	-	3 (17.7%)	2 (5.6%)
Rectal swab	-	-	17 (47.2%)
Clinical findings			
Symptomatic	40 (48.2%)	8 (47.1%)	13 (36.1%)
Asymptomatic	43 (51.8%)	9 (52.9%)	23 (63.9%)
STI coinfections			
MG mono-infection	18	12	16
<i>Chlamydia trachomatis</i>	10 ^a	-	1
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-	-	3
Syphilis (data only from HIV+ patients)	-	1	4
Commensal mycoplasmas [*]	55	4 ^b	12
Macrolide resistance	25/80 ^{**} (31.2%)	11/17 (64.7%)	25/36 (69.4%)
A2058G (pyrosequencing)	14 (32.5%)	2 (11.8%)	11 (30.6%)
A2059G (pyrosequencing)	9 (20.9%)	8 (47.1%)	4 (11.1%)
A2058T (pyrosequencing)	2 (4.6%)	1 (5.9%)	-
Resistance detected (ResistancePlus [®])	Not determined	Not determined	10 (27.8%)
No resistance detected (ResistancePlus [®])	Not determined	Not determined	5 (13.9%)
Wild-type (pyrosequencing)	55 (35%)	6 (35.2%)	5 (13.9%)
Not performed	3 (7%)	-	1 (2.7%)
Fluoroquinolone resistance	1/28	1/9	-
Yes (<i>parC</i> mutation)	1	1	-
No	27	8	-
Not performed	55	8	-

MSW—men who have sex with women; MSM—men who have sex with men. ^{*} Commensal mycoplasmas—*M. hominis*, *U. parvum*, *U. urealyticum*. ^{**} Three women samples could not be analyzed for MLR. ^a In 8/10 cases, codetection with other agents (*M. hominis*, *Ureaplasma* spp.). ^b In all cases, codetection with *U. parvum*.

**Figure 2.** MLR strains detected during the study period.

Macrolide resistance prevalence was also calculated in both study periods, observing a slight increase in 2018 (26%) in relation with the previous phase (22.2%).

Interestingly, when focusing on the HIV cohort only, the prevalence of macrolide resistance was 73.7% (28/38), with the clinical records showing a previous antibiotic regimen in 19.8% of cases, predominantly macrolides.

A total of 72 specimens had a mutation conferring MLR detected by pyrosequencing and this method revealed four different types of mutation. The most prevalent mutation was A2058G ($n = 41$, 56.9%), followed by A2059G ($n = 27$, 37.5%), A2058T ($n = 3$, 4.2%), and A2062T ($n = 1$, 1.4%).

The subset of 100 samples with MLR detected by pyrosequencing was further analyzed for MLR by the ResistancePlus[®] MG kit and for fluoroquinolone resistance detection. As

the ResistancePlus[®] MG assay offers MG detection data, a comparison between that assay and the Allplex STI-7 assay could be performed, with an overall agreement regarding MG detection of 87% between both techniques. When MLr detection was compared, the agreement between the ResistancePlus[®] MG kit and pyrosequencing was 95.4%.

Regarding fluoroquinolone resistance (FQR), 97 out of the 100 samples showed a wild-type *parC* gene, whereas three of them had the mutation Ser83(80)Ile. Remarkably, these three strains were also macrolide resistant, corresponding in two cases to men with urethritis and one 18-year-old woman for whom the first sample (collected after an empiric 5 day-course ML treatment) showed an A2059G mutation/*parC* wild-type strain. The woman was subsequently treated with moxifloxacin and the test of cure showed a double resistance pattern (A2059G/Ser83(80)Ile) after fluoroquinolone therapy.

3. Discussion

Mycoplasma genitalium is a pathogen associated with NGU, balanoposthitis, and chronic prostatitis in men, as well as cervicitis and PID among other consequences in women [1]. Treatment failures are especially concerning due to MG's capacity of acquiring mutations that confer macrolide or fluoroquinolone resistance. Since 1983, when MG was described as a new species in the urogenital tract [19], multiple reports focusing on antibiotic resistance have been published in Europe [20] and worldwide [21]. Unfortunately, there are limited data of MG infections and resistance patterns in Spain [15–18].

Most of the MG-positive results came from people below 25 years-old in our study, related to the epidemiological surveillance system to monitor *C. trachomatis* (CT) performed in Catalonia since 2007. This fact implies that the higher burden of samples received in the microbiology departments for STI testing belong to this population group. Among the HIV cohort, rectal positivity was higher in asymptomatic patients, as previously described by Read et al. [22].

In our setting, multiplex PCR detecting seven STIs and urogenital bacteria (*C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*, *M. hominis*, *U. urealyticum*, and *U. parvum*) is currently employed [23]. However, according to most international guidelines [4,24], MG testing is only recommended based on presence of symptoms or in current sexual partners of persons infected with MG in order to avoid unnecessary treatments leading to antibiotic resistance [25,26]. In our case, if MG is detected, clinical records are checked to look for symptoms. If there is no history of any patient's symptomatology or if the patient is not a sexual partner of a positive case, MG positivity is not displayed. In the same way, commensal bacteria such as *Ureaplasma* spp. or *M. hominis* can be detected with the multiplex PCR simultaneously to "true" STI agents. Given their uncertain pathogenic role and controversial treatment benefits [27], these bacteria are only reported in exceptional cases to avoid antimicrobial resistance development.

A comparison between the Allplex STI-7 and the ResistancePlus[®] MG kit for the detection of MG was performed in a subset of 100 samples, with an overall agreement of 87% (87/100). For 13 discordant cases, ResistancePlus[®] MG kit did not detect MG while Allplex gave a positive detection, with a subsequent successful 23S rRNA gene pyrosequencing. Therefore, the MG-negative results by the ResistancePlus[®] MG kit could be explained by low bacterial load plus potentially loss of DNA integrity due to an additional freeze–thaw cycle (specimens were first tested by the Allplex STI-7 assay and then frozen at –20 °C until tested by ResistancePlus[®] MG). The target used for MG detection by Allplex STI-7 is unknown, while the assay ResistancePlus[®] MG amplifies the MgPa gene. Thus, a higher sensitivity in the target used by Allplex could also be responsible for its superior performance.

Pyrosequencing was employed as our main technique to detect MLr, given our prior experience of MLr mutation detection in *M. pneumoniae* [28]. Samples from quality controls were used as references, demonstrating the robustness of the developed method. The commercial assay ResistancePlus[®] MG kit was also evaluated in a subset of 100 samples. This assay is very convenient for high-throughput laboratories and can be easily implemented

in routine diagnosis, allowing MG detection and macrolide resistance determination as a one-step method without requiring specialized instrumentation and covering that need reflected in the current guidelines [4]. However, this assay is not suitable for epidemiological or research purposes on mutation types as it only detects a specific set of 23S rRNA variations associated with MLr but does not distinguish among them nor detects new ones, in contrast to pyrosequencing. Additionally, the lack of a 23S internal control for MLr targets implies that this kit does not discern between absence of mutation and absence of 23S rRNA gene amplification, leading to a risk of false susceptible results when the 23S rRNA gene is not amplified, as previously reported by Le Roy et al. [29]. When compared with pyrosequencing, the overall agreement was 95.4% (83/87). Among the four discordant results, one mutated strain by pyrosequencing was informed as negative by ResistancePlus[®] MG due to late detection (Ct > 30), which might correspond with low bacterial load. Unfortunately, due to insufficient material, those four specimens could not be tested again.

Overall, the macrolide resistance rate detected in our setting was 23.1%. Our rate is similar to other studies performed in different parts of our country [30–32]—slightly higher than the 16.3% detected in the Basque Country [17] but lower than the 36.4% reported by de Salazar et al. [33] in southern Spain. However, their cohort included 25% of MSM versus 9.1% in our cohort. Focusing on Catalonia, our prevalence of resistance is similar to the one reported by Muñoz-Santa et al. (23%) [34] and between the rates published by Lucena-Nemirosky et al. (12.6%) in a routine diagnostic service [18] and Fernández-Huerta et al. (36.1%) in a STI Unit [15].

Among the HIV cohort, given that 94.7% of them were MSM, the high rate of MLr (73.7%) is consistent with previous data reported by Barberá et al. in Spain [35], demonstrating that MSMs have a higher risk of acquisition of macrolide-resistant MG, and by Dionne-Odom et al.'s study, reporting a prevalence of multidrug resistant MG of 74.1% in HIV-MSM patients in Alabama [36]. The subsequent risk of treatment failure highlights the need to perform diagnosis and macrolide resistance detection simultaneously.

Fluoroquinolone resistance (FQr) detection performed in a subset of samples ($n = 100$) showed 3% of resistant strains that harbored Ser83Ile mutation in the *parC* gene. This rate is slightly lower than those described in our country by Fernández-Huerta et al. (8.8%), Piñeiro et al. (7.9%), but not all of them were clearly implicated in treatment failure), de Salazar et al. (9.1%), and Adelantado and Beristain (5.5%) [13,17,32,33]. However, our results are concordant with the lower FQr prevalence detected in WHO European regions, in comparison with Western Pacific territories [21].

This study has several limitations. Firstly, our study population comprehended both symptomatic and asymptomatic individuals. This fact could affect macrolide and fluoroquinolone resistance values, in comparison with other Spanish studies [15,33]. Secondly, it was not possible to test all samples for ML resistance with both methods simultaneously. The use of only 100 samples for the comparison of both methods is a limitation of the study but gives a good insight into the usefulness of the pyrosequencing assay. Thirdly, for fluoroquinolone resistance, only *parC* gene was sequenced for being the most frequently involved in moxifloxacin failure [11].

4. Materials and Methods

4.1. Study Setting, Patients and Sample Collection, and Study Design

The Laboratori Clínic Metropolitana Nord, Germans Trias i Pujol University Hospital (Badalona, Spain) is a laboratory with an influence area covering a total of 1,500,000 inhabitants with more than 100 primary care facilities—including Sexual Reproductive Health Centers (ASSIR)—that centralizes the analysis of all the specimens together with the ones derived from the tertiary hospital Germans Trias i Pujol.

A total of 415 samples were collected by physicians between 2016 and 2018 from 407 patients for whom STI testing was ordered, including symptomatic, asymptomatic, or STI contacts.

Most samples ($n = 371$) belonged to young people recruited in ASSIRs for epidemiological surveillance purposes to monitor *C. trachomatis* (CT) prevalence among those under 25 years of age with high-risk sexual behavior [37]. This surveillance has been performed in Catalonia since 2007. The other 44 samples were from the HIV Unit or Gynecology and Obstetrics Department of the Germans Trias i Pujol University Hospital.

The study was designed with a retrospective and a prospective part. For the first phase, a retrospective analysis included 234 MG-positive samples received between 2016 and 2017. During the second phase, a one-year prospective study was carried out from December 2017 to November 2018. A total of 181 MG-positive samples were collected from 173 patients that required STI testing at our medical institution or ASSIR Centers (Badalona and Mataró, Barcelona, Spain). Detailed information is displayed in Table 1.

4.2. Clinical and Microbiological Data

Demographic data (gender, age) were recorded for all MG-positive patients, and epidemiological information such as risk factors for STI (more than 2 sexual partners in the last 6 months, new sexual partner, intermittent condom use, prior STI...), previous antibiotic therapy, symptomatology, and current treatment was registered in the prospective study when available (136 out of 181 patients included in the prospective evaluation). Microbiological data such as the detection of concomitant STIs, syphilis, or HIV, was provided by the Microbiology Department. More information can be found in Table 2.

4.3. Diagnosis of *Mycoplasma genitalium*

A variety of samples including endocervical, urethral, or rectal swabs and urine samples were molecularly tested for sexual transmitted diseases using the Real-Time PCR STI detection Allplex STI-7 Assay (Seegene Inc., Seoul, Korea), following the manufacturer's instructions. DNA was previously extracted by either the Microlab NIMBUS (Hamilton Company, Reno, NV, USA) or the STARlet IVD platforms (Seegene Inc., Seoul, Korea).

4.4. Macrolide and Fluoroquinolone Resistance Detection

MG-positive samples were subsequently investigated for macrolide resistance by pyrosequencing, as previously described [28], but using the primers described by Jensen et al. for both PCR and pyrosequencing [8]. The pyrosequencing protocol was optimized using a total of 6 MG-positive samples from external European and Spanish quality programs (Quality Control for Molecular Diagnostics program—QCMD and SEIMC Quality Control Program), sent to multiple laboratories as reference samples for MG detection and macrolide resistance analysis. Given that the mutations associated with macrolide resistance are located in region V of MG 23S rRNA gene, our prior pyrosequencing protocol [28] was modified to a single 45 cycles amplification with a final volume of 50 μ L. As previously described by Spuesens et al. [38], this protocol includes four general steps: generating 5'-biotinylated products, processing PCR products to obtain single-stranded DNA where the sequence primer will anneal, sequencing, and analyzing the results.

With this purpose, PCR mixtures (50 μ L) contained 0.4 μ M of the biotinylated primers Mg 23S-1992Bio and Mg 23S-2138R [8], 0.2 mM of deoxynucleoside triphosphate set (Sigma Aldrich, San Luis, MO, USA), 1 \times Pfu Buffer (Promega Corporation, Madison, WI, USA), 0.02 U/ μ L of Pfu DNA polymerase (Promega), 26.6 μ L of PCR grade water, and 15 μ L of DNA template. The following cycling conditions were used: 5 min at 94 $^{\circ}$ C, followed by 45 cycles of 30 s at 94 $^{\circ}$ C, 30 s at 58 $^{\circ}$ C, and 30 s at 72 $^{\circ}$ C. A negative control was taken along in each PCR run. The presence of the 147-bp amplified fragment was detected by high-resolution capillary electrophoresis (QIAxcel[®] Advanced System, Qiagen, Germany).

The resulting biotinylated products were immobilized to Streptavidin Sepharose[™] High Performance beads (GE Healthcare) and processed to obtain high-quality single-stranded DNA using the Pyromark[™] Vacuum Prep Workstation, according to manufacturer's instructions. The immobilization and pyrosequencing reactions were based on the protocol of Spuesens et al. [38] with the following modifications: a total 4 μ L of streptavidin

beads and 26 μ L of H₂O per sample were used, and the plates were mixed for 10 min instead of 15 min [28].

To evaluate pyrosequencing as an adequate method for MLr study in MG, a subset of 100 samples previously processed by pyrosequencing and that included strains with A2058G ($n = 36$), A2059G ($n = 25$), or A2058T ($n = 3$) mutations and WT samples ($n = 36$) (including five samples from the European Quality Control—QCMD) was further analyzed by ResistancePlus[®] MG kit (SpeeDx, Sydney, NSW, Australia). This kit offers the simultaneous detection of MG and 5 mutations at positions 2058 and 2059 in the 23S rRNA gene (*E. coli* numbering) that are associated with macrolide resistance.

Finally, fluoroquinolone resistance was detected in the same subset by sequencing the *parC* gene [39,40]. Both processes were carried out at the University of Bordeaux, France.

5. Conclusions

This study provides valuable information about *M. genitalium* macrolide and fluoroquinolone resistance rates in the young population with STI risk in Badalona, Spain, where there was a lack of data for comparison with other European countries. Pyrosequencing, despite being more time-consuming, is a cheap and useful tool to detect MLr, allowing epidemiological purposes and new mutations description. Given the rate of resistant strains detected in Badalona, Spain, simultaneous and accurate diagnosis of MG and its ML resistance patterns, using either in-house or commercial near-patient reagents that provide results without delay, should be implemented in clinical laboratories. These technologies could substantially improve patient's clinical management applying resistance-guided treatment strategies, decreasing treatment failures, and lowering total costs.

Author Contributions: Conceptualization, L.M., G.F.-R. and B.R.; methodology, L.M., G.F.-R. and B.R.; validation, C.L.R., G.F.-R., E.J.-L. and B.R.; formal analysis, E.J.-L. and B.R.; investigation, C.L.R., C.C., V.G., J.H.W.-W. and B.R.; resources, C.B., S.P., C.L.R., L.M., V.G. and B.R.; data curation, E.J.-L., J.H.W.-W., C.L.R. and B.R.; writing—original draft preparation, B.R.; writing—review and editing, L.M., C.B., S.P., G.F.-R., E.J.-L. and B.R.; funding acquisition, L.M. and B.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by a Germans Trias grant (Programa Talents, Fundació Catalunya-La Pedrera) and the fellowship awarded by the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC) to B.R. (Ayuda SEIMC 6/2019).

Institutional Review Board Statement: The study design, including the use of stored samples for the retrospective phase, was approved by the Clinical Research Ethics Committee at Germans Trias i Pujol University Hospital ("Comité Ético de Investigación Clínica", CEIC, code PI-17-182). The use of a subset of samples from the retrospective phase, belonging to users of Sexual Reproductive Care Centers, was also supported by the Ethics Committee (codes EO-12-014 and PI-17-217).

Informed Consent Statement: Written informed consent was obtained from patients during the prospective phase of the study.

Data Availability Statement: Data are available on reasonable request from the corresponding author.

Acknowledgments: We would like to thank the molecular biology area for their technical support.

Conflicts of Interest: The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Taylor-Robinson, D.; Jensen, J.S. *Mycoplasma genitalium*: From Chrysalis to multicolored butterfly. *Clin. Microbiol. Rev.* **2011**, *24*, 498–514. [\[CrossRef\]](#)
2. Lis, R.; Rowhani-Rahbar, A.; Manhart, L.E. *Mycoplasma genitalium* infection and female reproductive tract disease: A meta-analysis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2015**, *61*, 418–426. [\[CrossRef\]](#)
3. Jensen, J.S. *Mycoplasma genitalium*: The aetiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* **2004**, *18*, 1–11. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

4. Jensen, J.S.; Cusini, M.; Gomberg, M.; Moi, H.; Wilson, J.; Unemo, M. 2021 European guideline on the management of *Mycoplasma genitalium* infections. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* **2022**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lau, A.; Bradshaw, C.S.; Lewis, D.; Fairley, C.K.; Chen, M.Y.; Kong, F.Y.; Hocking, J.S. The Efficacy of Azithromycin for the Treatment of Genital *Mycoplasma genitalium*: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2015**, *61*, 1389–1399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Li, Y.; Le, W.J.; Li, S.; Cao, Y.P.; Su, X.H. Meta-analysis of the efficacy of moxifloxacin in treating *Mycoplasma genitalium* infection. *Int. J. STD AIDS* **2017**, *28*, 1106–1114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Mena, L.A.; Mroczkowski, T.F.; Nsuami, M.; Martin, D.H. A randomized comparison of azithromycin and doxycycline for the treatment of *Mycoplasma genitalium*-positive urethritis in men. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2009**, *48*, 1649–1654. [[CrossRef](#)]
8. Jensen, J.S. Protocol for the detection of *Mycoplasma genitalium* by PCR from clinical specimens and subsequent detection of macrolide resistance-mediating mutations in region V of the 23S rRNA gene. *Methods Mol. Biol.* **2012**, *903*, 129–139. [[CrossRef](#)]
9. Touati, A.; Peuchant, O.; Jensen, J.S.; Bebear, C.; Pereyre, S. Direct detection of macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium* isolates from clinical specimens from France by use of real-time PCR and melting curve analysis. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, 1549–1555. [[CrossRef](#)]
10. Le Roy, C.; Bebear, C.; Pereyre, S. Performance of Three Commercial Molecular Diagnostic Assays for the Simultaneous Detection of *Mycoplasma genitalium* and Macrolide Resistance. *J. Clin. Microbiol.* **2021**, *59*, e00020-21. [[CrossRef](#)]
11. Couldwell, D.L.; Tagg, K.A.; Jeffreys, N.J.; Gilbert, G.L. Failure of moxifloxacin treatment in *Mycoplasma genitalium* infections due to macrolide and fluoroquinolone resistance. *Int. J. STD AIDS* **2013**, *24*, 822–828. [[CrossRef](#)]
12. Hamasuna, R.; Le, P.T.; Kutsuna, S.; Furubayashi, K.; Matsumoto, M.; Ohmagari, N.; Fujimoto, N.; Jensen, J.S. Mutations in ParC and GyrA of moxifloxacin-resistant and susceptible *Mycoplasma genitalium* strains. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0198355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Fernandez-Huerta, M.; Bodiyaabadu, K.; Esperalba, J.; Bradshaw, C.S.; Serra-Pladevall, J.; Garland, S.M.; Fernandez-Naval, C.; Jensen, J.S.; Pumarola, T.; Ebeyan, S.; et al. Multicenter clinical evaluation of a novel multiplex real-time PCR (qPCR) assay for detection of fluoroquinolone resistance in *Mycoplasma genitalium*. *J. Clin. Microbiol.* **2019**, *57*, e00886-19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Sweeney, E.L.; Lowry, K.; Ebeyan, S.; Lundgren, M.; Whiley, D.M. Evaluation of the SpeedX MG parC (Beta) PCR Assay for Rapid Detection of *Mycoplasma genitalium* Quinolone Resistance-Associated Mutations. *J. Clin. Microbiol.* **2020**, *58*, 4045–4048. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Fernandez-Huerta, M.; Vall, M.; Fernandez-Naval, C.; Barbera, M.J.; Arando, M.; Lopez, L.; Andreu, A.; Pumarola, T.; Serra-Pladevall, J.; Esperalba, J.; et al. *Mycoplasma genitalium* macrolide resistance update: Rate among a 2016–2017 cohort of patients in Barcelona, Spain. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2019**, *38*, 99–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Fernandez-Huerta, M.; Serra-Pladevall, J.; Esperalba, J.; Espasa, M. *Mycoplasma genitalium* and fluoroquinolone resistance: From genotype to phenotype. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2019**, *38*, 44–45. [[CrossRef](#)]
17. Pineiro, L.; Idigoras, P.; de la Caba, I.; Lopez-Olaizola, M.; Cilla, G. Guided antibiotic therapy for *Mycoplasma genitalium* infections: Analysis of mutations associated with resistance to macrolides and fluoroquinolones. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2019**, *37*, 394–397. [[CrossRef](#)]
18. Lucena Nemirosky, J.; Espelt, R.; Lopez Grado, E.; Sobrino, J.; Acera, A.; Perez, J.; Jensen, J.S.; Sanchez-Reus, F.; Prim, N. Macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium* in Catalonia, Spain: A 1 year prospective study. *J. Antimicrob. Chemother.* **2021**, *76*, 2702–2707. [[CrossRef](#)]
19. Tully, J.G.; Taylor-Robinson, D.; Rose, D.L.; Cole, R.M.; Bove, J.M. *Mycoplasma genitalium*, a new species from the human urogenital tract. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **1983**, *33*, 387–396. [[CrossRef](#)]
20. Fernandez-Huerta, M.; Barbera, M.J.; Serra-Pladevall, J.; Esperalba, J.; Martinez-Gomez, X.; Centeno, C.; Pich, O.Q.; Pumarola, T.; Espasa, M. *Mycoplasma genitalium* and antimicrobial resistance in Europe: A comprehensive review. *Int. J. STD AIDS* **2020**, *31*, 190–197. [[CrossRef](#)]
21. Machalek, D.A.; Tao, Y.; Shilling, H.; Jensen, J.S.; Unemo, M.; Murray, G.; Chow, E.P.F.; Low, N.; Garland, S.M.; Vodstrcil, L.A.; et al. Prevalence of mutations associated with resistance to macrolides and fluoroquinolones in *Mycoplasma genitalium*: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* **2020**, *20*, 1302–1314. [[CrossRef](#)]
22. Read, T.R.H.; Murray, G.L.; Danielewski, J.A.; Fairley, C.K.; Doyle, M.; Worthington, K.; Su, J.; Mokany, E.; Tan, L.T.; Lee, D.; et al. Symptoms, Sites, and Significance of *Mycoplasma genitalium* in Men Who Have Sex with Men. *Emerg. Infect. Dis.* **2019**, *25*, 719–727. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Fernandez, G.; Martro, E.; Gonzalez, V.; Saludes, V.; Bascunana, E.; Marco, C.; Rivaya, B.; Lopez, E.; Coll, P.; Matas, L.; et al. Usefulness of a novel multiplex real-time PCR assay for the diagnosis of sexually-transmitted infections. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2016**, *34*, 471–476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Soni, S.; Homer, P.; Rayment, M.; Pinto-Sander, N.; Naous, N.; Parkhouse, A.; Bancroft, D.; Patterson, C.; Fifer, H. British Association for Sexual Health and HIV national guideline for the management of infection with *Mycoplasma genitalium* (2018). *Int. J. STD AIDS* **2019**, *30*, 938–950. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Cina, M.; Baumann, L.; Egli-Gany, D.; Halbeisen, F.S.; Ali, H.; Scott, P.; Low, N. *Mycoplasma genitalium* incidence, persistence, concordance between partners and progression: Systematic review and meta-analysis. *Sex. Transm. Infect.* **2019**, *95*, 328–335. [[CrossRef](#)]

26. Vazquez, F.; Fernandez, J. Resistance-Guided Therapy for *Mycoplasma genitalium* Infections. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2020**, *71*, 1469–1471. [[CrossRef](#)]
27. Horner, P.; Donders, G.; Cusini, M.; Gomberg, M.; Jensen, J.S.; Unemo, M. 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. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* **2018**, *32*, 1845–1851. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Rivaya, B.; Jordana-Lluch, E.; Fernandez-Rivas, G.; Molinos, S.; Campos, R.; Mendez-Hernandez, M.; Matas, L. Macrolide resistance and molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* infections during a 4 year period in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* **2020**, *75*, 2752–2759. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Le Roy, C.; Henin, N.; Bebear, C.; Pereyre, S. Evaluation of a Commercial Multiplex Quantitative PCR (qPCR) Assay for Simultaneous Detection of *Mycoplasma genitalium* and Macrolide Resistance-Associated Mutations in Clinical Specimens. *J. Clin. Microbiol.* **2017**, *55*, 978–979. [[CrossRef](#)]
30. Asenjo, A.; Kusters, J.G.; Severs, T.T.; Alos, J.I. *Mycoplasma genitalium* in Spain: Prevalence of genital infection and frequency of resistance to macrolides. *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.* **2018**, *36*, 169–171. [[CrossRef](#)]
31. Trevino, M.; Rodriguez-Velasco, M.; Manso, T.; Cea, M. *Mycoplasma genitalium* in Primary Care: Prevalence and azithromycin resistance in Santiago de Compostela Health Care Area. *Rev. Esp. Quimioter.* **2021**, *34*, 496–499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Adelantado Lacasa, M.; Beristain, X. Prevalence of *Mycoplasma genitalium* infection and antibiotic resistance in Navarra (North Spain). *Sex. Transm. Infect.* **2019**, *95*, 549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. de Salazar, A.; Barrientos-Duran, A.; Espadafor, B.; Fuentes-Lopez, A.; Chueca, N.; Garcia, F. Macrolide and fluoroquinolone resistance of *Mycoplasma genitalium* in southern Spain, 2018–2019. *Sex. Transm. Infect.* **2021**, *97*, 8–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Munoz Santa, A.; Aramburu Arnelos, J.; Bernet Sanchez, A.; Belles Belles, A. *Mycoplasma genitalium*: Analysis of mutations associated with macrolide resistance in Lleida, Spain. *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.* **2021**, *285*, 106034. [[CrossRef](#)]
35. Barbera, M.J.; Fernandez-Huerta, M.; Jensen, J.S.; Caballero, E.; Andreu, A. *Mycoplasma genitalium* Macrolide and Fluoroquinolone Resistance: Prevalence and Risk Factors among a 2013–2014 Cohort of Patients in Barcelona, Spain. *Sex. Transm. Dis.* **2017**, *44*, 457–462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Dionne-Odom, J.; Geisler, W.M.; Aaron, K.J.; Waites, K.B.; Westfall, A.O.; Van Der Pol, B.; Xiao, L. High Prevalence of Multidrug-Resistant *Mycoplasma genitalium* in Human Immunodeficiency Virus-Infected Men Who Have Sex with Men in Alabama. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2018**, *66*, 796–798. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Lopez-Corbeto, E.; Gonzalez, V.; Casabona, J.; Grupo de estudio CN-A. Prevalence and re-infection rate of *C. trachomatis* genital infections in young people under 25 years in Catalonia. *Enferm. Infecc. Y Microbiol. Clin.* **2017**, *35*, 359–363. [[CrossRef](#)]
38. Spuesens, E.B.; Hoogenboezem, T.; Sluijter, M.; Hartwig, N.G.; van Rossum, A.M.; Vink, C. Macrolide resistance determination and molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* by pyrosequencing. *J. Microbiol. Methods* **2010**, *82*, 214–222. [[CrossRef](#)]
39. Tagg, K.A.; Jeffreys, N.J.; Couldwell, D.L.; Donald, J.A.; Gilbert, G.L. Fluoroquinolone and macrolide resistance-associated mutations in *Mycoplasma genitalium*. *J. Clin. Microbiol.* **2013**, *51*, 2245–2249. [[CrossRef](#)]
40. Yamaguchi, Y.; Takei, M.; Kishii, R.; Yasuda, M.; Deguchi, T. Contribution of topoisomerase IV mutation to quinolone resistance in *Mycoplasma genitalium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 1772–1776. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Listado de abreviaturas

Ac: anticuerpo

ADP: adenosin difosfato

Ag: antígeno

RNA: ácido ribonucleico

ATP: adenosin trifosfato

BAL: lavado broncoalveolar

CMI: concentración mínima inhibitoria

CT: *Chlamydia trachomatis*

DNA: ácido desoxirribonucleico

EIP: Enfermedad inflamatoria pélvica

FTIR: Espectroscopía de Infrarrojos por Transformada de Fourier

G+C: guanina y citosina

HSH: hombres que tienen sexo con hombres

ID: índice de discriminación

IFN- γ : interferón gamma

Ig: inmunoglobulina

IL: interleucinas

ITS: infecciones de transmisión sexual

kDa: kilodalton

kb: kilobases

LAMP: *loop-mediated isothermal amplification*

LPS: lipopolisacárido

MALDI-ToF: *Matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight*

MLVA: *multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis*

Mpb: pares de megabases

NA-SERS: *nanorod array-surface enhanced Raman spectroscopy*

NAC: neumonía adquirida en la comunidad

NASBA: *Nucleic Acid Sequence Based Amplification*

NG: *Neisseria gonorrhoeae*

NGS: Next Generation Sequencing

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PMN: leucocitos polimorfonucleares

POC: point of care

PPLO: *pleuropneumonia-like organisms*

rRNA: ácido ribonucleico ribosómico

SJS: Síndrome de Stevens-Johnson

SNC: sistema nervioso central

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

TOC: test of cure

UNG: Urethritis no gonocócica

VIH/HIV: virus de la inmunodeficiencia humana

WGS: Whole Genome Sequencing

1. Introducción

1.1. Género *Mycoplasma*

1.1.1. Descubrimiento/historia

Con el objetivo de proporcionar una información útil y ordenada, considero necesario realizar, en primer lugar, una pequeña revisión acerca del origen etimológico del término “mycoplasma”, para, a continuación, hacer un repaso histórico sobre el descubrimiento de las principales especies, centrándonos en las dos que son objeto de esta tesis: *Mycoplasma pneumoniae* y *Mycoplasma genitalium*.

Etimología del término “micoplasma”

El término “mycoplasma” (de aquí en adelante, micoplasma) tiene origen griego (*mykes*: hongo, *plasma*: formado) y fue propuesto por primera vez en 1889 por Albert Bernhard Frank, biólogo alemán, para designar al organismo productor de nódulos en las raíces de las leguminosas. Inicialmente lo identificó como un hongo, dado que citológicamente formaba unas estructuras invasivas similares a micelio fúngico (no se conocía ninguna bacteria capaz de producir hifas), considerándolo una mezcla de protoplasma fúngico y vegetal.

Posteriormente, en 1897, Jakob Eriksson mantuvo el concepto de hongo, y usaba el término micoplasma para referirse a “la forma simbiótica latente en la que el hongo vivía durante largos periodos de tiempo en la planta afectada”. Se generó una gran controversia con este término, y no fue hasta 1929 cuando Julien Nowak decidió utilizarlo nuevamente en su publicación acerca del microbio causal de la pleuroneumonía bovina, pero en esta ocasión, con carácter taxonómico.

Finalmente, en 1955, y a pesar de que este término originariamente se hubiese utilizado en micología, la forma protoplásmica con gran plasticidad celular y la estructura similar a un micelio concordaba perfectamente con los agentes causales de la pleuroneumonía bovina. Tras la aceptación por el Comité Internacional en Nomenclatura Bacteriana, Freundt fue el encargado de escribir la descripción y clasificación de *Mycoplasmatales* para la séptima edición del Manual Bergey, en el cual se aceptó esta nomenclatura como legítima y adecuada para designar taxonómicamente el género (1).

El descubrimiento de los micoplasmas a lo largo de la historia

Para encontrar los primeros datos reportados sobre las especies pertenecientes a este género, debemos remontarnos a 1898, cuando Nocard y Roux describieron el primer micoplasma aislado en cultivo. Este se trataba del agente causal de la pleuroneumonía

bovina, actualmente conocido como *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (2). En los años posteriores, se sospechó de la existencia de ciertas “bacterias parásitas” relacionadas con la enfermedad en animales (y su posible implicación en patología humana), que fueron catalogadas como organismos similares a los que producían pleuroneumonía bovina (PPLO, pleuropneumonia-like organisms), dado su parecido al agente descrito previamente.

En 1930, Klieneberger propuso que se tratarían de “formas L” de las bacterias, carentes de pared celular, pero que estarían asociadas por simbiosis a otras bacterias que sí poseían pared (3). En ese momento, se inició un amplio debate entre aquellos que pensaban que los micoplasmas se trataban de una especie única, frente a los que defendían que se trataba de variantes carentes de pared de otras especies bacterianas ya conocidas y que, por tanto, no merecerían una categoría taxonómica propia.

El término micoplasma se emplearía entonces de forma generalizada para englobar a todos aquellos microorganismos PPLO, con independencia de su origen humano o animal.

En 1937, Dienes y Edsall detectaron y aislaron el primer micoplasma en humanos en un absceso de una glándula de Bartolino (4), y fue probablemente el que hoy conocemos como *Mycoplasma hominis*.

Posteriormente, Eaton y colaboradores consiguieron aislar en tejido celular un nuevo “virus” causante de neumonía atípica en 1944 (5). Para ello, utilizaron esputos provenientes de pacientes enfermos e inocularon, por vía intranasal, suspensiones de dichos esputos a diversos roedores y embriones de pollo. Con este experimento, constataron la aparición de una clínica y lesiones pulmonares similares a las observadas en humanos. Además, el uso de suero de la fase de convalecencia de pacientes con neumonía atípica (pacientes que ya están en el periodo de recuperación de la enfermedad) neutralizaba el cuadro neumónico, no siendo así con el suero obtenido en la fase aguda del proceso. Gracias a este experimento, el “virus” en cuestión recibió el nombre de Agente Eaton, y es el que en la actualidad conocemos como *Mycoplasma pneumoniae*.

En los años 50 se realizaron diversos experimentos y estudios de campo en voluntarios, que confirmaron que el agente Eaton podía causar infección respiratoria de vías bajas en humanos y que además producía una respuesta inmune específica, generando anticuerpos que protegían al individuo frente a las manifestaciones más graves en las reinfecciones (6).

Paralelamente, en el año 1954, Shepard describió las “cepas T” de micoplasma o T-micoplasmas (en referencia a “tiny-form colonies”, por su pequeño tamaño que oscila entre

7 y 15µm). Estos T-micoplasmas fueron clasificados posteriormente como ureaplasmas, y se aislaron por primera vez *in vitro* a partir de muestras de pacientes con cuadros de uretritis no gonocócica (UNG) y asintomáticos (7). Durante esta década, también se describieron otras especies, como *M. fermentans* y *M. salivarium*.

Durante muchos años, el agente Eaton continuaba considerándose un posible virus, pero diversos estudios contrariaban esta definición. Por un lado, su mayor tamaño (180-250µm) respecto al correspondiente para los virus y por otro, su sensibilidad a diversos antibióticos, ponían en entredicho esta clasificación. Se realizaron múltiples trabajos para profundizar en el conocimiento de este agente: Marmion y Goodburn consiguieron observar formas cocobacilares en epitelio bronquial de un embrión de pollo infectado con el agente Eaton (8) y Clyde reportó la presencia de formas extracelulares, similares a colonias, en tinciones de tejidos previamente infectados (9). Estas visualizaciones concordaban con los puntos de positividad observados en los estudios de inmunofluorescencia, por lo que, en ese momento, se planteó la posibilidad de que el agente Eaton se tratase en realidad de un PPLO y no de un virus. Finalmente, Chanock et al. consiguieron cultivar de forma extracelular el agente en 1961 (10), confirmándolo como un PPLO y proponiendo en el año 1963 su nomenclatura actual (11).

Fue precisamente en esta década de los sesenta cuando finalmente se demostró que los micoplasmas eran un conjunto único dentro de los procariontes y totalmente diferenciados de las “formas L” bacterianas. Su incapacidad para sintetizar una pared celular independientemente de las circunstancias, su contenido en guanina-citosina y los ensayos de hibridación DNA-DNA hacían de ellos un grupo digno de tener nomenclatura propia.

En los años setenta, se comenzó a estudiar pacientes que poseían clínica de uretritis aguda no gonocócica en los que no se conseguía aislar ninguno de los patógenos causantes ya conocidos, como clamidia, ureaplasmas o diversas especies de micoplasmas urogenitales. Curiosamente, dichas infecciones respondían al tratamiento con tetraciclina, lo que hacía pensar que alguna nueva bacteria no descrita hasta ese momento podía ser la responsable del cuadro. Además, la observación microscópica en campo oscuro de exudados uretrales de pacientes con uretritis, en ocasiones revelaba la presencia de formas espirales móviles que no correspondían con *Treponema pallidum*. Estos microorganismos helicoidales recordaban al género *Spiroplasma*, cuyas especies infectan animales y plantas, por lo que la idea de una nueva especie que infectara a los humanos comenzó a tomar fuerza (12).

En 1981, Taylor-Robinson et al. consiguieron cultivar y aislar, en medio SP4 y tras casi un mes de incubación, un nuevo patógeno en 2 de 13 pacientes con clínica de uretritis no

gonocócica, el cual correspondía con un micoplasma pero con características biológicas, patogénicas y serológicas propias y distintas al resto de especies descritas previamente, por lo que fue propuesto como una nueva especie: *Mycoplasma genitalium* (12, 13).

Desde el descubrimiento de *M. genitalium*, otras cuatro especies han sido descritas en el ser humano: en 1985, *Mycoplasma pirum* (14), aislado posteriormente en pacientes con VIH pero sin implicaciones clínicas definidas; en 1991, *Mycoplasma spermatophilum* (aislado en muestras de semen y endocervicales) (15) y *Mycoplasma penetrans*, cuya mayor parte de los aislamientos se ha realizado en pacientes VIH (16) y, finalmente, *Mycoplasma amphoriforme* en 2005 en el tracto respiratorio de pacientes con bronquitis recurrente (17).

1.1.2. Clasificación taxonómica de *Mollicutes*

Las bacterias del género *Mycoplasma* (familia *Mycoplasmataceae*, orden *Mycoplasmatales*) son microorganismos procariontes taxonómicamente englobados en la clase *Mollicutes*. Dicho vocablo proviene del latín (*mollis*: suave, *cutis*: piel), haciendo referencia directa a la carencia de pared celular que presenta este género.

La clase *Mollicutes* engloba a microorganismos que carecen de pared celular, así como de dotación genética para la síntesis del peptidoglicano y poseen un menor tamaño que la mayoría de las bacterias. Su clasificación taxonómica es compleja y ha ido variando a lo largo de los años. En 1978, Gibbons y Murray propusieron que la mayor parte de los procariontes deberían clasificarse en función de la presencia y tipo de pared celular o su ausencia (18). Inicialmente, todos aquellos microorganismos carentes de pared celular se incluyeron en un único grupo. Posteriormente, los estudios genéticos basados en 16S RNAr mostraron que los mollicutes habían evolucionado a partir de células grampositivas tipo *Clostridium* por sucesivas deleciones genéticas, lo que los relacionaba filogenéticamente con la división *Firmicutes* (19). El hecho de englobar a los mollicutes junto a diversos géneros de bacterias grampositivas, llevó a Murray, en 1984, a proponer que la clase *Mollicutes* se diferenciase en la nueva división *Tenericutes* (20). Tras diversos cambios, esta clasificación es la que se encuentra vigente en la actualidad, tal como queda reflejada en la versión más reciente del manual Bergey (21).

El término “micoplasma” se ha utilizado clásicamente para referirse a todos los integrantes de la clase *Mollicutes*, en la actualidad se prefiere reservar esta nomenclatura únicamente para los microorganismos del género *Mycoplasma*, utilizando “mollicutes” como término más apropiado para referirse al grupo completo.

La clase *Mollicutes* comprende a su vez cuatro órdenes bacterianos: *Mycoplasmatales*, *Entomoplasmatales*, *Acholeplasmatales* y *Anaeroplasmatales*.

El análisis de las secuencias de 16S rRNA ha permitido clasificar los *Mollicutes* en órdenes, que incluyen diversas familias y géneros (21):

- Orden *Mycoplasmatales*: incluye los géneros *Mycoplasma* y *Ureaplasma*, así como dos géneros de bacterias hemotrópicas, *Eperythrozoon* y *Haemobartonella*, antiguamente agrupados en *Rickettsia*.
- Orden *Entomoplasmatales*: aislados en insectos y plantas. Incluye los géneros *Entomoplasma* (requiere colesterol para su crecimiento), *Mesoplasma* (no requieren colesterol para su crecimiento) y *Spiroplasma*.
- Orden *Acholeplasmatales*: incluye el género *Acholeplasma*, así como los fitoplasmas, una serie de especies no cultivables cuyo ciclo se desarrolla en plantas e invertebrados, a los cuales se ha englobado provisionalmente en el género “*Candidatus Phytoplasma*”.
- Orden *Anaeroplasmatales*: anaerobios estrictos. Incluye los géneros *Anaeroplasma* (requiere esteroides para su crecimiento) y *Asteroleplasma* (no requiere esteroides).

En esta tesis se profundizará en el conocimiento de dos de las especies del género *Mycoplasma*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Mycoplasma genitalium*, por tratarse de dos de las principales especies patógenas para el ser humano.

1.1.3. Características celulares

Las bacterias del género *Mycoplasma* (familia *Mycoplasmataceae*, orden *Mycoplasmatales*) pertenecen a la clase *Mollicutes*, y constituyen un grupo complejo y excepcional entre los procariontes. Caracterizados principalmente por poseer un único cromosoma circular de entre 0.58 a 2.2 Mpb, un bajo contenido en guanina y citosina (G+C, 23-40% molar) y la ausencia permanente de pared celular, siendo incapaces de sintetizar ni la pared ni sus precursores en ninguna circunstancia.

Los estudios de las secuencias del 16S rRNA sugieren que esta clase habría evolucionado a partir de un ancestro común tipo *Clostridium*, que mediante sucesivas deleciones genéticas, dio lugar a un grupo de bacterias grampositivas (incluyendo bacilos, estreptococos y lactobacilos) con un bajo contenido en G+C y genoma bacteriano de pequeño tamaño hace unos 605 millones de años (22).

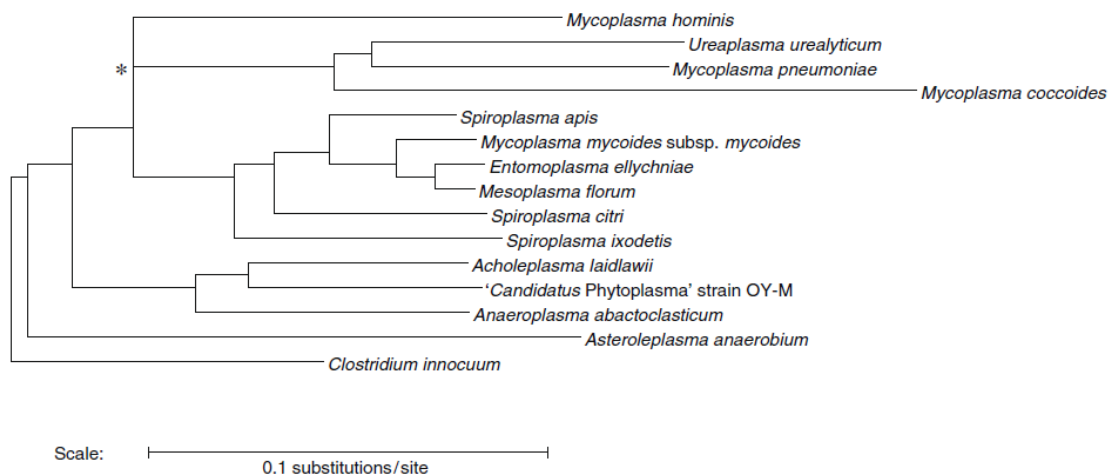


Figura 1: Filogenia de los micoplasmas reconstruida por comparación de secuencias de 16S rRNA.

Extraída de: Brown DR. Tenericutes. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. p. 1-3

En general, son bacterias aerobias o anaerobias facultativas con una serie de requerimientos nutricionales específicos que hacen que su cultivo sea altamente fastidioso, con una temperatura óptima de crecimiento de 37°C, pero cuyo rango puede oscilar entre 20°C y 45°C. Su tamaño es menor que la mayoría de las bacterias. De hecho, son las bacterias más pequeñas con vida libre y capacidad de división autónoma.

La mayoría de las especies son específicas para cada huésped. Entre las 15 especies de micoplasmas aisladas en el ser humano, trece de ellas pertenecen al género *Mycoplasma* y dos al género *Ureaplasma*, siendo la boca, el tracto respiratorio superior y el genitourinario sus principales tejidos de colonización. Muchas de las especies son comensales a nivel orofaríngeo, pudiendo causar dificultades diagnósticas con especies patógenas como *M. pneumoniae* si se desplazan al tracto respiratorio inferior.

Su distribución es universal en la naturaleza, y entre las más de 200 especies descritas, observamos que una gran mayoría de ellas corresponden con especies comensales y un pequeño porcentaje actúan como patógenas, ya sea en el hombre, animales o plantas.

Su transmisión puede darse por contacto directo venéreo (genital-genital y oral-genital), transmisión vertical (por vía intrauterina o al nacimiento), por aerosoles respiratorios o fómites (como en *M. pneumoniae*) o incluso se podría dar una transmisión yatrogénica en el caso de tejidos trasplantados.

Para establecer si una especie es comensal o patógena, el hecho de aislarla en un individuo sano no implica necesariamente que se trate de una especie comensal, así como su detección en un tejido de un paciente enfermo no es un factor suficiente para establecer

su capacidad de producir enfermedad (especialmente cuando se aísla junto a otras especies bacterianas).

Tal como refería el doctor D. Taylor-Robinson en 1996 (23), los criterios que debe cumplir una especie para ser catalogada como patógena son los siguientes:

1. La tasa de aislamiento en pacientes/animales enfermos debe ser significativamente superior a su aislamiento en sanos.
2. Un número mayor de micoplasmas de la especie en estudio son recuperados de pacientes/animales enfermos y no de sanos.
3. Se observa una respuesta inmune específica con la formación de anticuerpos en los pacientes/animales enfermos y ocurre de forma significativamente más frecuente que en los sanos.
4. Existe respuesta clínica al tratamiento con antibióticos al que el micoplasma es sensible *in vitro* y que lleva a la eliminación de la bacteria.
5. El antibiótico que inhibe el micoplasma, pero no otros agentes, produce un efecto clínico beneficioso.
6. Cuando un micoplasma de origen humano infecta a un animal, produce en él una enfermedad similar a la que produce en humanos, susceptible al antibiótico correspondiente y asociada a una respuesta inmune mediada por anticuerpos.
7. Cuando el micoplasma se inocula experimentalmente en voluntarios, produce una enfermedad similar a la que se produce de forma natural, que responde al antibiótico adecuado y que genera una respuesta inmune por anticuerpos.
8. Los anticuerpos específicos contra el micoplasma (inducidos de forma natural o por inmunización) protegen frente al desarrollo de la enfermedad.

Teniendo en cuenta los criterios anteriores, en la Tabla 1 se exponen las especies del género *Mycoplasma* de origen humano aisladas hasta la actualidad:

Tabla 1: Especies de *Mycoplasma* de origen humano

Extraída de: Taylor-Robinson D, Jensen JS. *Mycoplasma genitalium*: from Chrysalis to multicolored butterfly. Clinical microbiology reviews. 2011;24(3):498-514.

TABLE 1. Some features of *Mycoplasma* species of human origin

Species	Yr first isolated or named	Primary site colonized		Metabolism of:		Considered pathogenic
		Genital tract	Respiratory tract	Glucose	Arginine	
<i>M. hominis</i>	1937	+			+	+
<i>M. fermentans</i>	1952	+?		+	+	+
<i>U. urealyticum</i> ^a	1954	+				+
<i>M. salivarium</i>	1955		+		+	
<i>M. primatum</i>	1955		+		+	
<i>M. pneumoniae</i>	1962		+	+		+
<i>M. orale</i>	1964		+		+	
<i>M. buccale</i>	1965		+		+	
<i>M. faucium</i>	1965		+		+	
<i>M. lipophilum</i>	1974		+		+	
<i>M. genitalium</i>	1981	+		+		+
<i>M. pirum</i>	1985	+		+		?
<i>M. spermatophilum</i>	1991	+			+	?
<i>M. penetrans</i>	1991	+		+	+	?
<i>M. amphoriforme</i>	2005		+	+		?

^a Metabolizes urea uniquely. In 2002, it was divided into *U. urealyticum* and *U. parvum* ?, not certain.

Dentro del género *Acholeplasma* también existen dos especies que han sido aisladas en el ser humano: *A. laidlawii* y *A. oculi*.

Además de las especies expuestas anteriormente, existen algunos micoplasmas de origen zoonótico que ocasionalmente han sido aisladas en el ser humano causando algún tipo de patología. Una descripción más detallada se puede encontrar en la revisión realizada por Gómez-Rufo et al. (24).

Tal y como se ha explicado anteriormente, los microorganismos de la clase *Mollicutes*, y entre ellos, los micoplasmas, poseen una serie de características biológicas que los hacen únicos y exclusivos entre las bacterias:

- a. **Carencia de pared celular:** incapaz de sintetizar pared celular ni precursores del peptidoglicano en ninguna circunstancia al carecer de dichos genes en su pequeño genoma. El hecho de no tener pared implica una serie de características:
 - i. Pleomorfismo: no se pueden clasificar dentro de ninguna morfología concreta (cocos, bacilos...) como el resto de las bacterias. Habitualmente se pueden observar desde formas esféricas a formas filamentosas tipo botella, jarrón o pera, y algunas especies presentan un orgánulo terminal. Esta plasticidad celular es la que provoca su característico crecimiento en agar, con pequeñas colonias de menos de 1 mm de diámetro en forma de “huevo frito” o “cabeza de coliflor” (por su incrustación entre las trabéculas del agar) que deben observarse con lupa o microscopio para su correcta visualización.

- ii. Poseen citoesqueleto formado por una red de proteínas, que modula su forma y participa en los procesos de fisión binaria. A pesar de que la mayoría de las especies son inmóviles, en las especies móviles contribuye a la movilidad por desplazamiento (*gliding motility*).
 - iii. Sensibilidad al choque osmótico y a los detergentes: necesitan una estabilidad osmótica por su falta de pared celular. Esto implica una alta sensibilidad a la desecación, lo que influye tanto en su transmisión como en el manejo de las muestras destinadas a cultivo.
 - iv. Resistencia intrínseca a todos aquellos antibióticos que actúan inhibiendo alguno de los pasos de la síntesis de la pared celular.
 - v. No pueden ser teñidos por la tinción de Gram, por ser una tinción específica de la pared celular.
- b. **Tamaño menor que la mayoría de las bacterias:** tal y como mencionábamos anteriormente, son las bacterias de vida libre más pequeñas con capacidad de división autónoma. Su tamaño celular oscila desde 0.4-0.5 μm de diámetro en formas cocoides, como *Ureaplasma* spp. o *M. hominis*, hasta estructuras alargadas en forma de huso de 1-2 μm de largo y 0.1-0.2 μm de ancho, como *M. pneumoniae* (25). Son, por ejemplo, en torno al 5% del tamaño de un *Bacillus*, lo que les proporciona capacidad para atravesar los filtros de 0.45 μm utilizados para filtrar medios de cultivo. Esto convierte a los micoplasmas en contaminantes frecuentes de líneas celulares, especialmente *M. fermentans* y *M. orale*, ambos aislados en el ser humano (26). Además, no se pueden observar por microscopía convencional y tampoco producen turbidez al crecer en medios de cultivo líquidos.
- c. **Escasa dotación de vías metabólicas:** su genoma es tan pequeño que carece de genes para la síntesis de aminoácidos, y tienen muy pocos genes relacionados con la síntesis de vitaminas, ácidos grasos, colesterol o precursores de ácidos nucleicos. Esto los hace totalmente dependientes del aporte exógeno de estas sustancias, ya sea por parte del hospedador o de medios de cultivo enriquecidos especialmente para su crecimiento. Su metabolismo se centra en la producción de energía y en menor grado a la síntesis de componentes, aunque compensan la escasez de vías

metabólicas con la presencia de un sistema enzimático reducido pero capaz de interactuar con múltiples sustratos.

La mayoría de micoplasmas son quimioorganotrofos, generando energía mediante el metabolismo de glucosa o arginina, o, en el caso de los ureaplasmas, únicamente requerir urea, ya que están dotados de una ureasa muy potente que les permite hidrolizar la urea y sintetizar ATP.

- d. **Dependencia de la célula hospedadora:** los *Mollicutes* nunca han sido encontrados como microorganismos de vida libre en la naturaleza, si no que dependen totalmente del hospedador. Establecen una especie de parasitismo de superficie con células de los epitelios o del sistema inmunitario del huésped (o localización intracelular en algunos casos), para obtener todos aquellos componentes que no pueden sintetizar de forma autónoma.
- e. **Requerimiento de esteroides para su cultivo *in vitro*:** componentes necesarios para la síntesis de la membrana celular de triple capa, que son aportados al medio de cultivo mediante la adición de suero.
- f. **Sistema respiratorio truncado:** a pesar de tener presentes las reacciones de la glucólisis, carecen del ciclo del ácido tricarbóxico completo, de las vías de fosforilación oxidativa para la síntesis de ATP así como de quinonas y citocromos.
- g. **Posibilidad de síntesis de cápsula:** tanto en *M. pneumoniae* como en otras especies de *Mollicutes*. En 1976, Wilson et al. describieron por primera vez la presencia de componente mucopolisacárido externo a la membrana celular y se cree que podría tener función de adherencia, aunque este hecho no ha podido ser confirmado (25).
- h. **Uso diferencial del codón de terminación (UGA):** en el código genético existen una serie de codones universales de terminación en la síntesis de proteínas: UAG, UAA y UGA. En el caso de este último, se ha demostrado que en algunas especies de *Mycoplasma* (entre ellas *M. pneumoniae* y *M. genitalium*) este codón codifica para el aminoácido triptófano (en lugar de ser una señal de parada), lo que es una propiedad particular de este tipo de bacterias y les dota de una serie de proteínas exclusivas que nunca se expresarían en otros géneros bacterianos, en los que el codón UGA actúa como señal de terminación de la traducción (27).

1.1.4. Factores de patogenicidad

Los micoplasmas se encuentran como comensales en los diferentes epitelios del ser humano, estableciendo una relación casi “parasitaria” que les facilita la supervivencia. Presentan una especificidad de tejido u órgano según su especie. Por ejemplo, *M. pneumoniae* coloniza de manera preferente el epitelio respiratorio, así como *M. genitalium* lo hace en el tracto genitourinario, aunque esto no excluye que ambas especies, relacionadas genéticamente, se hayan descrito en el hábitat predominante de la otra aunque aún no esté claro qué genes contribuyen a la afinidad por un determinado tejido (28).

Por otro lado, se ha observado que en pacientes que padecen algún tipo de inmunodeficiencia (hipogammaglobulinemias, SIDA o tratamiento con fármacos inmunosupresores) se han aislado en sangre o articulaciones algunas especies de micoplasmas que en inmunocompetentes actúan como comensales en sus tejidos afines (29, 30).

En el caso las especies patógenas, si producen infección, esta será leve y de curso crónico en la mayoría de los casos. Esta cronicidad está asociada con distintos factores de virulencia que repasaremos de forma general en este apartado, focalizando en los detalles específicos de las especies a estudio en esta tesis en los subapartados correspondientes.

Los principales factores de virulencia que presentan los micoplasmas son los siguientes:

1. Citoadherencia y penetración celular: la adherencia a las células de los epitelios respiratorio y genitourinario es un factor imprescindible para conseguir en primer lugar la colonización del tejido y posteriormente provocar la infección. Esta adherencia les permite también lesionar la célula afectada e interferir en su metabolismo. Para ello, especies como *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *M. penetrans* y *M. fermentans* están dotadas de un orgánulo de adherencia terminal que, en combinación con otras proteínas específicas de especie, les permiten unirse a la superficie de los epitelios para posteriormente penetrar en la célula.

El hecho de que bacterias con tan escasa dotación genética destinen múltiples genes a codificar proteínas para la adherencia y penetración celular revelan la importancia de este proceso en su supervivencia.

2. Localización intracelular: se han realizado numerosos estudios acerca de la capacidad de supervivencia de los micoplasmas en interior de células con capacidad fagocitaria (macrófagos, leucocitos polimorfonucleares) (31), pero su capacidad de penetrar en las células epiteliales que colonizan es un tema en

estudio. Tras el descubrimiento de *M. penetrans* (nombrado así por su alta capacidad de internalizarse en diferentes tipos celulares, tanto *in vitro* como *in vivo*) (16), numerosos estudios han querido clarificar el mecanismo de entrada de los diferentes micoplasmas. Algunas especies, como *M. genitalium*, poseen una organela terminal que intervendría en la internalización (32). Sin embargo, se han descrito especies que carecen de dicha estructura, como *M. hominis*, que también se han detectado a nivel intracelular (33). Por este motivo, la entrada del micoplasma al interior de la célula sería el resultado de múltiples procesos, como su capacidad invasiva (alteración del citoesqueleto o vías de señalización), o el hecho de que, al no tener pared, podrían fusionarse con la membrana de la célula a la que están colonizando para acceder a su interior. Este hecho explicaría su resistencia a antibióticos como la gentamicina (que no penetra en células eucariotas) y la cronicidad de las infecciones, ya que evadirían el sistema inmune por su localización intracelular (34).

3. Citotoxicidad e inflamación: los micoplasmas son capaces de secretar numerosas enzimas y activar el proceso de inflamación mediante la producción de citocinas. Numerosos estudios *in vitro* han demostrado la capacidad para afectar tanto a la mitogénesis celular como a los procesos de apoptosis o antiapoptosis de los micoplasmas. Además, su actividad clastogénica produciendo inestabilidad y reordenamientos en el genoma, podría estar implicada en los procesos oncogénicos en animales y humanos, pero para confirmar esta relación deben llevarse a cabo más estudios (35).
4. Evasión del sistema inmune: además de la localización intracelular de la que hemos hablado previamente, los micoplasmas poseen la capacidad de variación antigénica y de fase; es decir, son capaces de modificar sus lipoproteínas y antígenos de superficie para así poder ocultarse del sistema inmunitario. A pesar de su reducido genoma, estas bacterias poseen una alta capacidad de mutación como estrategia adaptativa de supervivencia.

Este sistema está basado en la presencia de elementos repetitivos en su genoma, que o bien se reordenan dando lugar a diferentes proteínas (en su composición o en su tamaño) o se expresan o no según la situación en la que se encuentre el microorganismo (sistema ON/OFF), formando un repertorio variable de antígenos de superficie que conforma lo que conocemos como variación de fase.

Un ejemplo de variación de fase puede observarse en el operon P1 de *M. pneumoniae* y en su homólogo MgPa en *M. genitalium*. Las proteínas P1 y MgPa

de ambas especies son altamente inmunogénicas y además las principales adhesinas con las que cuentan para unirse a los glóbulos rojos o a los epitelios. La presencia de elementos repetitivos en estos operones y su recombinación genética parece responsable de la variación antigénica en las lipoproteínas de su superficie (36).

5. Efecto inmunomodulador: los micoplasmas poseen una lipoproteína denominada MALP-2 (*macrophage activating lipopeptide of 2 kDa molecular weight*) con una estructura química y actividad similar al lipopolisacárido (LPS) presente en las bacterias gramnegativas (37). Esta molécula activa los macrófagos y monocitos, provocando la activación o supresión policlonal de varias estirpes de linfocitos de forma policlonal e inespecífica, producción de inmunoglobulinas y liberación de múltiples mediadores de la inflamación como TNF- α , IFN- γ y numerosas interleucinas (IL). Esta activación, en ocasiones, puede causar una exacerbación de la propia enfermedad por la gran inflamación generada.
6. Secreción enzimática: algunas especies de micoplasmas liberan componentes enzimáticos que intervienen en su patogenia. Por ejemplo, los ureaplasmas secretan fosfolipasas A1, A2 y C que actúan sobre la membrana fosfolipídica de la placenta, induciendo la secreción de prostaglandinas que inducen el parto y actuando sobre el surfactante pulmonar del feto; asimismo, los ureaplasmas también secretan proteasas que escinden la inmunoglobulina IgA. Otras especies, como *M. fermentans* y *M. pneumoniae* producen tirosina fosfatasa que interviene en su internalización, o exonucleasas para tener acceso a los nucleótidos de la célula hospedadora (38).

1.2. *Mycoplasma pneumoniae*

Mycoplasma pneumoniae es la especie de micoplasma que afecta al ser humano mejor conocida y más estudiada. A finales de los años treinta, durante la primera guerra mundial, se acuñó el término de “neumonía atípica primaria”, para englobar todas aquellas neumonías “no bacterianas” (y que, por tanto, no producían una condensación neumónica como tal en la radiografía de tórax) que se habían ido observando fundamentalmente en los campamentos militares, que no respondían a la penicilina y en las que en la tinción de Gram o cultivo bacteriano no revelaban la presencia de ningún germen conocido (de ahí lo de “primaria”). Estos cuadros cursaban con un inicio más lento y una duración mayor a la habitual, y los signos radiológicos, de estar presentes, mostraban una afectación pulmonar irregular y multilobar.

Posteriormente, se ha observado que además de *M. pneumoniae*, múltiples agentes causales de diferente naturaleza, ya sea bacteriana (*Legionella* spp., *Chlamydia* spp.), vírica (virus de la gripe, virus respiratorio sincitial, adenovirus...) o fúngica (*Pneumocystis jirovecii*) pueden causar este tipo de neumonías, las cuales suponen un síndrome opuesto a la neumonía típica, representada por la neumonía lobar causada por *Streptococcus pneumoniae* (39).

En la actualidad, se estima que es el causante de un 20-40% de las neumonías adquiridas en la comunidad (NAC) (40).

1.2.1. Características celulares

Mycoplasma pneumoniae es uno de los organismos patógenos más pequeños de vida libre. Su genoma posee tan solo 816.394 pb y 687 genes que codifican para proteínas (41), lo que implica que su tamaño es 5 veces menor que el del genoma de *Escherichia coli*.

Dado que se trata de un patógeno intracelular facultativo, su crecimiento en cultivo es lento y complejo, requiriendo un aporte de suero y extracto de levadura al agar y considerándose un microorganismo “fastidioso” desde el punto de vista microbiológico. Las colonias obtenidas son de muy pequeño tamaño (50-100 μm) y tienen una característica morfología de “huevo frito”, debido a que la parte central densa de la colonia queda inmersa en el agar, mientras que la periferia menos densa se extiende sobre el mismo.

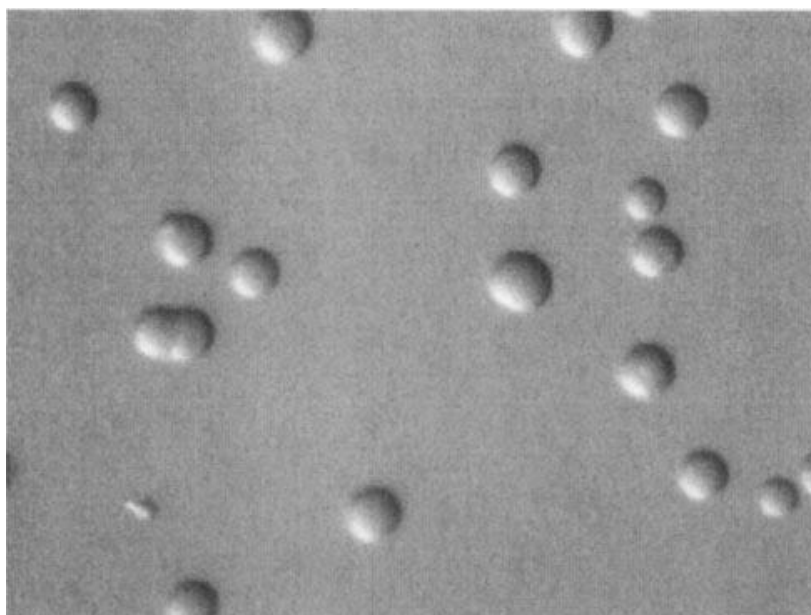


Figura 2: Colonias de *M. pneumoniae* en agar SP4. Imagen aumentada (x95) Extraída de: Waites KB, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Clinical microbiology reviews*. 2004;17(4):697-728

Esta especie es capaz de fermentar la glucosa, almidón, xilosa o manosa, entre otros azúcares y posee una hemolisina capaz de lisar, en 24-48 horas, hematíes humanos, de caballo o de cobaya en medio artificial, por lo que esta propiedad se utilizaba para distinguir *M. pneumoniae* de otros micoplasmas no patógenos colonizadores del tracto respiratorio, que carecían de esta capacidad (42).

Como todos los micoplasmas, solo está rodeado de una membrana externa trilaminar, careciendo de pared celular, lo que implica que no se puede visualizar por tinción de Gram. Se reproduce mediante fisión binaria, con una primera fase en la que se duplica la organela, la cual se desplaza al extremo opuesto durante la replicación, para finalmente dividirse en dos nuevas células, cada una provista de su organela terminal.

Esta organela parece estar asociada a la movilidad por deslizamiento (*gliding motility*) observada en *M. pneumoniae* sobre cristal o estructuras sólidas, ya que la microscopía electrónica descarta la presencia de otros elementos motrices, como podrían ser cilios o flagelos (43).

La adherencia a las células del epitelio pulmonar es esencial para el desarrollo de la enfermedad, ya que evita la eliminación del microorganismo mediante el aclaramiento mucociliar y le permite producir algunos efectos citotóxicos a nivel local. La organela terminal está directamente implicada en este proceso, en el que un complejo proteico interviene en la adhesión a receptores del ácido siálico, a la fibronectina o a la mucina de la mucosa respiratoria. Entre las proteínas anteriores, cabe destacar la proteína P1, una adhesina primaria de 170 kDa clave en los procesos de unión a la célula hospedadora. Su ausencia genera cepas avirulentas y los anticuerpos frente a ella bloquean la unión de la bacteria al epitelio respiratorio (44). Sus variaciones originan a las cepas de *M. pneumoniae* de tipo 1 y 2, cuya distinción es de gran interés en vigilancia, epidemiología y clínica producida (38).

Junto a la citadherencia, la patogenia se sustenta en la liberación de radicales superóxido y peróxido de hidrógeno, que al incrementar los derivados oxigenados generados a nivel endógeno dañan el epitelio respiratorio (45). Este proceso tóxico causa ciliostasis, marginación de la cromatina, vacuolización y exfoliación progresiva que deterioran la integridad del epitelio respiratorio en dos o tres días (38, 46).

Durante muchos años se pensó que *M. pneumoniae* no era una bacteria toxigénica y que el daño del tejido respiratorio se desarrollaba como hemos descrito anteriormente, hasta el año 2006, en el que se descubre la toxina del Síndrome de Dificultad Respiratoria Adquirida en la Comunidad (CARDS, *Community-Acquired Respiratory Distress Syndrome*) con

actividad ADP-ribosilasa y de vacuolización citoplasmática. El análisis de su secuencia de aminoácidos indica que presenta una estructura similar a otras toxinas bacterianas, como la subunidad S1 de la toxina de *Bordetella pertussis*, la toxina del cólera de *V. cholerae* o la toxina diftérica de *C. diphtheriae* (47). Solamente se han encontrado proteínas similares codificadas en el genoma de algún otro micoplasma, por lo que se trataría de una molécula específica de este género. Su actividad complementa los efectos descritos anteriormente, incluyendo además producción de citocinas, eosinofilia e hiperreactividad de la vía aérea, de forma similar a lo que ocurre con el asma. Los niveles de expresión de toxina CARDS en cepas de tipo 2 son mayores que en cepas de tipo 1, lo que explica su mayor toxigenicidad (48, 49). Esta toxina está directamente relacionada con la severidad de la enfermedad, pudiendo persistir en los pacientes durante periodos muy prolongados de tiempo. Además, es altamente inmunogénica, produciendo una respuesta humoral superior a la causada por la proteína P1 (44). Sin embargo, y a pesar de su potencial, aún no se ha empleado a nivel clínico como marcador diagnóstico de la infección (47). En cuanto a su uso como diana de una futura vacuna, estudios recientes hechos en ratones muestran que la inmunización con toxina CARDS recombinante mejora el daño pulmonar, la infiltración neutrofílica, la producción de citocinas y el número de microorganismos en vías respiratorias, lo que implica que la vacuna no solo mejoraría la inflamación asociada, sino que también disminuiría la persistencia del microorganismo (50).

Otro de los potenciales factores de virulencia de *M. pneumoniae* es la lipoproteína MPN133, a la que se le atribuye una doble función: por un lado, se encarga de la captación de glicerol libre y por otro, actúa como una nucleasa citotóxica dependiente de calcio esencial para atravesar la membrana citoplasmática y nuclear de la célula correspondiente. En la actualidad no se sabe qué interrelación puede existir entre estas dos funciones, habiéndose observado que se trataría de un factor de virulencia específico de *M. pneumoniae*, ya que la proteína homóloga en *M. genitalium* no posee esta actividad (44).

Mycoplasma pneumoniae también es capaz de formar biofilms formados por polisacáridos, proteínas y lípidos, donde queda encapsulado y protegido de la acción de los antibacterianos. Además, las características del biofilm son diferentes en función del tipo de cepa bacteriana (tipo 1 o 2), confiriendo diferentes patrones de resistencia, tanto a los antibióticos como a la acción del sistema inmune (51, 52).

1.2.2. Epidemiología

Mycoplasma pneumoniae es un patógeno exclusivamente humano y de distribución universal que causa infecciones tanto de tracto respiratorio superior como de tracto respiratorio inferior de forma endémica y epidémica en diferentes lugares del planeta con climas muy variables. La patología que produce de forma más frecuente es la traqueobronquitis, pero a nivel de relevancia clínica, la neumonía es el principal cuadro de interés. Se estima que a niveles endémicos *M. pneumoniae* causa de un 4-8% de neumonías adquiridas en la comunidad (NAC). Este porcentaje se eleva hasta un 20-40% en los picos epidémicos en la población general, aumentando hasta un 70% en el caso de instituciones/poblaciones cerradas (53, 54).

Aunque la mayor parte de los casos se producen al final del verano y en otoño, se pueden detectar infecciones a lo largo de todo el año. Algunos estudios apuntan a que las temperaturas más altas podrían favorecer la infección, de ahí que muchos de los casos se detecten en los meses más cálidos (55, 56), aunque no está del todo claro que esta bacteria presente estacionalidad en sus infecciones.

Clásicamente, las infecciones se presentan en picos epidémicos cada cuatro a siete años de media, aunque desde 2010 se ha registrado un aumento de casos en el norte de Europa, así como en China, Japón, Chile, Brasil o Israel en el mismo periodo (44). Se cree que estas fluctuaciones de casos pueden estar relacionadas con cambios antigénicos en las cepas, disminución de la inmunidad de rebaño, o ambas causas.

La proporción de infecciones varía en función de la edad del paciente, siendo más frecuente en niños en edad escolar y adolescentes, entre 5 y 15 años (resultado concordante con el obtenido durante nuestro estudio), aunque puede afectar a individuos de cualquier edad (44). En general, en los niños menores de 3 años se suele manifestar como cuadros de infección respiratoria de vías altas, mientras que de los 5 a los 20 años las presentaciones más comunes son la bronquitis y neumonía (57).

Mycoplasma pneumoniae se transmite de persona a persona, a través de la tos y la propagación de gotículas infecciosas. Además, los enfermos pueden permanecer en estado de portador durante periodos prolongados de tiempo a pesar de la desaparición de la mayoría de los síntomas o el uso de tratamientos antibióticos eficaces para erradicar la infección.

Se han realizado algunos estudios en familias, donde se ha visto que, aunque la enfermedad se propaga lentamente, lo hace a una tasa elevada, por el hecho de que los pacientes son portadores durante periodos prolongados. De hecho, en el estudio en

familias realizado por Foy et al., se constató la propagación en 23 de 36 familias, de las cuales el 41% de los adultos y el 84% de los niños se infectaron (58).

La inexistencia de guías internacionales acerca de los requerimientos de monitorización de las infecciones producidas por *M. pneumoniae*, el análisis de resistencia a macrólidos o estudios de epidemiología molecular de cepas hace que los datos acerca de esta enfermedad estén subestimados. Países como Francia o Estados Unidos realizan el registro en algunas regiones concretas mientras que otros, como Dinamarca o Japón, poseen una red de vigilancia a nivel nacional. Es necesario tener en cuenta que, aun con un sistema de vigilancia bien establecido, los casos reales serán superiores a las cifras disponibles, las cuales estén probablemente mermadas por diversas razones que llevan al infradiagnóstico de estas infecciones:

- La mayoría de los casos son relativamente leves, por lo que no existe confirmación microbiológica
- Su sintomatología se asemeja en gran medida a otras infecciones respiratorias
- Muchos pacientes pueden permanecer en estado de portador asintomático durante periodos variables de tiempo
- Inexistencia de tests point-of-care (POC) fiables para su detección, lo que lleva a la administración de tratamientos empíricos sin realización del diagnóstico microbiológico.

En Catalunya, las infecciones por *M. pneumoniae* diagnosticadas en el laboratorio son de declaración microbiológica obligatoria en el Sistema de Notificación Microbiológica de Catalunya (SNMC). Anualmente, la Sub-direcció General de Vigilància i Resposta a Emergències de Salut Pública, publica un informe detallado con los datos de infecciones declaradas en el año previo. Los datos disponibles más recientes son de 2019, año en el que se registraron 310 infecciones por *Mycoplasma pneumoniae* en Catalunya, con el pico de casos situado en la semana 20 del año. El 50% de casos se detectó en hombres (N=155) y el 50% de casos en mujeres (N=155). Respecto a la edad de los pacientes, el grupo más afectado correspondió con los niños de 5 a 9 años (N=85, 27,4%), seguido de los de uno a cuatro años (N=65, 21%) y los de 10 a 14 años (N=33, 10,6%).

En cuanto a la distribución temporal de las epidemias, se puede observar con claridad el inicio de un pico epidémico en el año 2012, la cual correspondió con el inicio de uno de los estudios en el que se basa esta tesis.

Los datos expuestos pueden consultarse con mayor detalle en las tablas y figuras adjuntas:

Tabla 2: Distribución según grupos de edad

Grupo de edad	Frecuencia	Totales (%)
1 mes – 11 meses	3	1.0
1-4 años	65	21.0
5-9 años	85	27.4
10-14 años	33	10.6
15-19 años	19	6.1
20-29 años	21	6.8
30-39 años	25	8.1
40-49 años	20	6.5
50-59 años	12	3.9
≥ 60 años	27	8.7
TOTAL	310	100,0%

Tabla 3: Distribución según el sexo

Sexo	Frecuencia	Totales (%)
Femenino	155	50
Masculino	155	50
No consta		
TOTAL	310	100

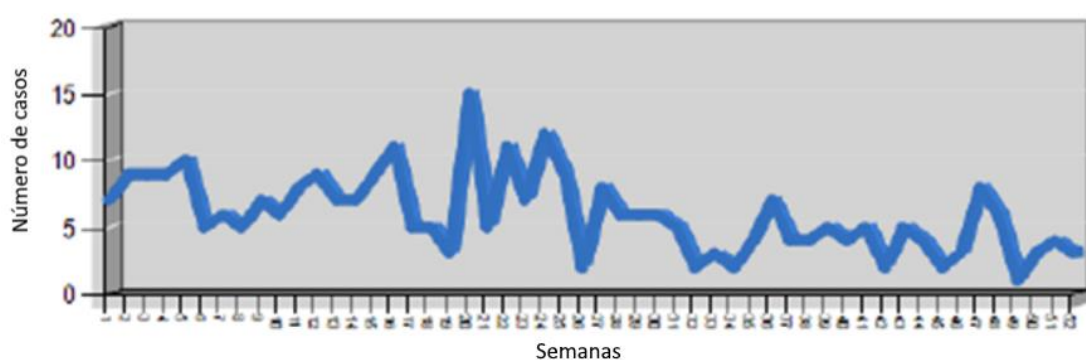


Figura 3: Distribución semanal de casos

Tabla 4: Distribución según el tipo de muestra analizada

Muestra	Frecuencia	Totales (%)
Suero	247	78,2
Aspirado nasofaríngeo	63	19,9
Por fibroscopia	2	0,6
Sangre	2	0,6
Espujo	2	0,6
TOTAL	316	100,0%

Tabla 5: Distribución según el tipo de técnica empleada en el diagnóstico

Técnica	Frecuencia	Totales (%)
Cultivo	1	0,3
Detección de ácidos nucleicos	68	18,2
IgM	247	66,0
Título alto	55	14,7
Seroconversión	2	0,5
Otras técnicas (IgG+IgM)	1	0,3
TOTAL	374	100%

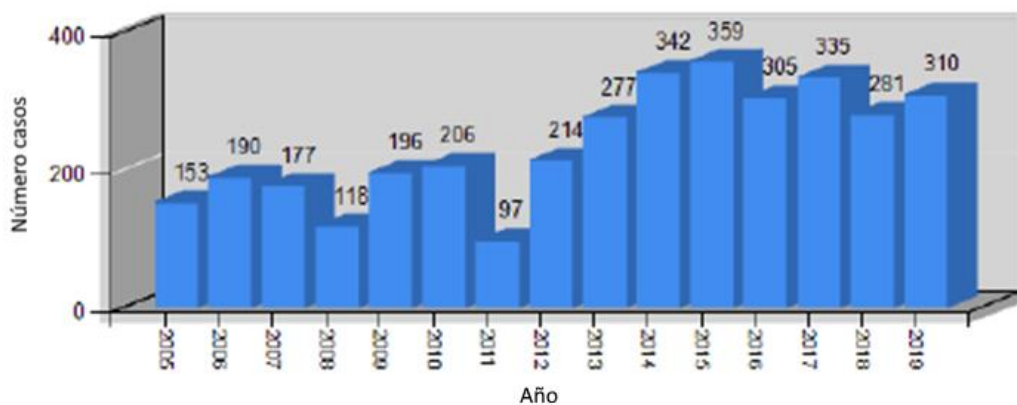


Figura 4: Evolución anual 2005-2019

Fuente: Informe sobre els microorganismes declarats a l'SNMC durant l'any 2019. Infeccions de les vies respiratòries: *Mycoplasma pneumoniae*. Sub-direcció General de Vigilància i Resposta a Emergències de Salut Pública. Abril 2021.

Respecto a la situación a nivel nacional, al no existir ningún tipo de registro oficial de las infecciones causadas por *M. pneumoniae*, no hay datos globales disponibles, sino que podemos encontrar revisiones focalizadas en diferentes comunidades autónomas. Aguilera-Alonso et al. publicaron una revisión sobre las características clínicas y epidemiológicas de las NAC en niños causadas por *M. pneumoniae* en Valencia en el periodo 2010-2015, observando un aumento significativo de casos en los años 2011 y 2015 (59), coincidente con los picos epidémicos detectados en el resto de Europa (60).

El primer caso de resistencia a macrólidos descrito en nuestro país se reportó en 2014, pero se trataba de un caso importado por una paciente de origen chino, donde las tasas de resistencia a estos antibióticos rozan el 100% (61). Sin embargo, acerca de los tipos de cepas circulantes o la tasa de resistencia a macrólidos en nuestro país, el artículo elaborado para esta tesis es el único reciente que aborda este tema.

En Europa, en respuesta al incremento de casos observado en varios países en 2016, el grupo de estudio de infecciones por micoplasma y clamidia (ESGMAC) de la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (ESCMID) realizó un estudio con el objetivo de conocer los métodos diagnósticos empleados en los diferentes países europeos, qué tipo de pacientes se testaban y si se determinaba resistencia a macrólidos. Asimismo, identificar picos epidémicos, analizar datos demográficos, verificar la coincidencia de los aumentos de casos entre las diferentes regiones y ver el efecto de la localización geográfica en la presentación de los picos epidémicos (60).

Para ello, recogieron datos entre 2011 y 2016 de 11 países europeos e Israel, periodo en el que se detectaron 3 picos epidémicos en el último trimestre del año y primero del siguiente (2011/12, 2014/15 y 2015/16). A pesar de que los picos de infecciones clásicamente se presentan cada 4 a 7 años, se ha descrito el hecho de que un pico epidémico se pueda alargar más de lo habitual (62, 63). Durante en este estudio se verificó que solo pasaron 3 años entre los dos primeros picos, y un año entre el segundo y el tercero, por lo que la posibilidad de que estos dos últimos periodos corresponda a un único pico epidémico alargado es más que plausible (60).

En cuanto a las técnicas diagnósticas empleadas, a diferencia de Catalunya, las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos fueron las más comúnmente empleadas, seguidas de la serología. El máximo de casos se produjo en la semana 48 de año 2011, alcanzando un

total de 1759 positivos. La detección de resistencia a macrólidos no se lleva a cabo de forma rutinaria en la mayoría de los países, por lo que existe una clara subestimación en los niveles de resistencias descritos en Europa, en comparación con Israel, que reporta un 30% y China, donde las cifras pueden llegar al 90-100% (60).

A pesar de que en la revisión de Beeton et al. se observa una relación entre el inicio del pico epidémico y la latitud del país en cuestión (en los países del norte, el pico epidémico adelanta su inicio respecto a los países del sur), los autores señalan que se requieren estudios más focalizados en este tema para profundizar en su conocimiento (60).

Además de las infecciones que causa de forma individual este microorganismo, los brotes en poblaciones cerradas (campamentos, escuelas, a nivel nosocomial...) son altamente características.

En Estados Unidos tampoco existe una red nacional de vigilancia de estas infecciones, pero los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) han participado a lo largo de los años en los estudios de diversos brotes registrados a nivel local. Entre 2006 y 2013, los CDC colaboraron en la investigación de 17 casos. Entre los más destacables, se encuentra el brote de Rhode Island, que afectó a 57 estudiantes de 4 escuelas en 2006-2007, incluyendo dos casos de encefalitis grave en niños (64). Asimismo, en 2011 se registró un brote en Virginia Occidental que implicaba a ocho escuelas de dos condados, detectando un total de 125 casos de neumonía, de los cuales 23/43 (53%) fueron positivos por PCR para *M. pneumoniae*. Además de escuelas, se registró un brote en un centro de larga estancia en Nebraska en 2014, afectando a 55 personas y produciendo 7 muertes, que resultó en el cierre temporal de la institución para nuevos pacientes. Por otro lado, los CDC también participan en la investigación de casos severos, como el de una paciente inmunocompetente que desarrolló una neumonía que requirió ventilación mecánica durante 13 días en Carolina del Sur en 2013, y donde días después dos familiares fueron igualmente diagnosticados de neumonía grave (65).

A pesar de la que neumonía es la manifestación clínica más frecuente, se detectó un brote en Colorado en el año 2013 donde el Síndrome de Stevens-Johnson (SJS) con lesiones cutáneo-mucosas fue la clínica predominante. Entre estos casos, se registraron hasta 3 genotipos diferentes por MLVA, por lo que los autores relacionan esta manifestación como coincidente con el aumento de casos presente por el brote epidémico que se estaba dando en ese momento, y no por la presencia de un genotipo específico que indujese SJS (44).

En Estados Unidos, el tipado de las cepas mediante MLVA (*multiple locus variable-number of tandem-repeat analysis*) reveló que los genotipos circulantes más frecuentes entre 2006 y 2013 correspondieron con el 4-5-6-2, 3-5-6-2 y 3-6-6-2 (66).

Japón es uno de los pocos países que posee un programa nacional de seguimiento de enfermedades infecciosas desde 1981, comenzando en primer lugar con un seguimiento de neumonías atípicas primarias general, que incluyó un apartado específico para las neumonías causadas por *M. pneumoniae* desde 1999 (67).

Esta red de vigilancia está formada por unos 500 hospitales centinela (centros con más de 300 camas y departamentos de pediatría y medicina interna), que declaran semanalmente aquellos casos de *M. pneumoniae* confirmado microbiológicamente que además presenten una clínica sugestiva. A pesar de que a través de este sistema no se facilitan datos sobre epidemiología de cepas o resistencia a macrólidos, la información disponible sobre los casos diagnosticados permite identificar rápidamente el inicio de los picos epidémicos o los brotes, de forma que los diferentes grupos de investigación pueden iniciar estudios más completos en este tipo de contexto (67).

Un sistema similar al japonés sería de gran utilidad a nivel europeo para poder monitorizar la situación actual real tanto en cuanto a número de casos como de cepas circulantes y tasa de resistencia a macrólidos.

1.2.3. Síndromes clínicos

1.2.3.1 Manifestaciones pulmonares

La mayor parte de las infecciones causadas por *M. pneumoniae* en niños y adolescentes cursan de manera sintomática. Si bien en los menores de 5 años el cuadro clínico consiste habitualmente en una rinitis, esta bacteria es capaz de causar hasta un 5% de casos de bronquiolitis.

En los niños mayores y adolescentes, lo más frecuente es una traqueobronquitis asociada a infección del tracto respiratorio superior, ya sea faringitis, rinitis u otitis media (57).

En los adultos, la neumonía es el cuadro habitual, conociéndose con el nombre de “neumonía atípica primaria” por sus peculiares características de presentación clínico-radiológica. Tras un periodo de incubación de 9 a 13 días (o incluso hasta 3 semanas según estudios clínicos), los síntomas se instauran de forma gradual, consistiendo en fiebre (inferior a 38.8°C), cefalea, mialgias y tos no productiva persistente, de carácter frecuente e inhabilitante (39). Esta tos puede ser seca o volverse productiva mucopurulenta al cabo

de unos días. Frecuentemente, se puede asociar faringitis no exudativa (sin linfadenopatía cervical), otitis, rinitis, traqueobronquitis o miringitis bullosa (de forma ocasional).

Este inicio gradual contrasta con el inicio repentino que causa la neumonía lobar clásica, en el que encontramos fiebre alta, escalofríos y pleuritis, así como de la causada por el virus Influenza, con fiebre alta y rápida progresión de los síntomas desde la nariz a las vías respiratorias bajas. La tos o traqueítis pueden causar dolor retroesternal, pero no dolor torácico pleurítico de forma habitual. Las manifestaciones gastrointestinales son infrecuentes.

La exploración física es más bien anodina (contrastando con el mal estado general que se observa en el paciente), auscultándose ligeros subcrepitantes en la mayoría de los casos, aunque excepcionalmente se pueden presentar crepitantes francos, roncus y sibilantes. La analítica complementaria puede revelar una discreta leucocitosis en un 30% de los pacientes.

En general, las pruebas de imagen muestran signos de una enfermedad más grave de lo esperado tras la exploración física. En la radiografía de tórax se observan infiltrados retículo-nodulillares parahiliares o peribronquiales que pueden ser uni o bilaterales, y un cierto grado de consolidación en una cuarta parte de los pacientes. En los casos graves, puede presentarse una bronconeumonía que se extiende desde el hilio y afecta al pulmón completo. En el caso de existir derrame pleural (5-20% casos), será pequeño y de tipo trasudado (68).

Otras manifestaciones respiratorias que se pueden presentar incluyen los abscesos pulmonares, el embolismo pulmonar, el derrame pleural con empiema, la bronquiolitis obliterante con neumonía asociada, la fibrosis intersticial crónica y el síndrome de distrés respiratorio del adulto (69).

En niños que presenten desórdenes inmunológicos tipo anemia de células falciformes, anesplenia funcional o síndrome de Down, la infección respiratoria puede ser grave o incluso fulminante. En el caso de la hipogammaglobulinemia, además es factor de riesgo para las enfermedades del tracto respiratorio y de sus complicaciones a nivel articular.

La evolución natural de esta enfermedad es de curso prolongado, con tos y fiebre hasta la tercera semana de evolución, presentando posteriormente una recuperación gradual. El tratamiento antibiótico correcto acorta su duración, si bien no erradican la bacteria, convirtiendo a algunos pacientes en portadores asintomáticos que continuarán transmitiendo la infección.

En los años setenta, se sugirió que *M. pneumoniae* podría tener relación con los cuadros de asma en niños. La mayoría de los cuadros están asociados con infiltración eosinofílica, atopia e infecciones respiratorias recurrentes. A pesar de existir una predisposición genética, únicamente se le pueden atribuir un 50% de los casos. Curiosamente, muchos de los genes implicados en el proceso asmático están a su vez asociados a las defensas del hospedador, hecho que apoya la relación del asma con las infecciones microbianas (44).

Diversos estudios realizados tienen como objetivo encontrar un patógeno bacteriano o viral que pueda estar relacionado con los cuadros asmáticos. Se ha demostrado que la colonización temprana de las vías respiratorias con microorganismos como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* o *Moraxella catarrhalis* está altamente asociada con el desarrollo de asma (70). Por este motivo, *M. pneumoniae* se trataría de un patógeno potencial, dada su capacidad de persistir en las vías respiratorias durante periodos de tiempo prolongados. La inflamación causada por la infección persistente podría favorecer el proceso, y el uso de azitromicina, por sus propiedades antiinflamatorias, podría beneficiar a los asmáticos portadores.

También es interesante saber si los pacientes con asma crónica están colonizados de forma más frecuente. En muchos casos, *M. pneumoniae* es detectado por técnicas moleculares (preferentemente en muestras de vías respiratorias bajas) pero las pruebas serológicas son negativas, infraestimando la proporción de pacientes realmente colonizados por este microorganismo (71, 72).

En general, parece que las exacerbaciones en el paciente asmático serían el resultado de la combinación de los factores hereditarios, junto con la exposición temprana a factores ambientales predisponentes, como son la disbiosis gastrointestinal o el menor contacto con factores microbiológicos ambientales, que son esenciales en el desarrollo de una correcta respuesta inmune pulmonar.

Con la irrupción de la pandemia causada por el SARS-CoV-2 (COVID-19) el pasado 2020, se han descrito casos de coinfección de este virus con *M. pneumoniae* (73). En uno de los estudios, los pacientes con coinfección presentaban tos más persistente, mayores niveles de bilirrubina, hipercoagulabilidad y trombosis más severa. La estancia hospitalaria y la fase de convalecencia tuvieron una duración superior que la de los pacientes sin coinfección, sin presentar mayor tasa de mortalidad. Sin embargo, dado que la sintomatología de ambas entidades es similar, es complicado saber a ciencia cierta si estas

manifestaciones están asociados a uno u otro microorganismo o si la presencia de ambos multiplica su efecto (73).

1.2.3.2 Manifestaciones extrapulmonares

A pesar de que las enfermedades respiratorias son la manifestación más frecuente de la infección por *M. pneumoniae*, se han descrito otro tipo de afectaciones extrapulmonares, que pueden presentarse aparecer antes, durante o tras el cuadro respiratorio, o en ausencia de cualquier síntoma respiratorio.

Los mecanismos por los que se desarrollan este tipo de complicaciones extrapulmonares son tres: en primer lugar, la liberación de citoquinas en respuesta directa a la presencia bacteriana en un órgano determinado que provocan la inflamación del mismo; en segundo lugar, los mecanismos de autoinmunidad o formación de inmunocomplejos, y en tercer lugar, la producción de vasculitis o trombosis como resultado de citoquinas o quimioquinas como el TNF- α o la IL-8 o por inmunomodulación a través de mediadores como el complemento o el D-dímero (74).

Las localizaciones extrapulmonares que se afectan con mayor frecuencia son la piel y mucosas, el sistema nervioso central (SNC), el sistema hematopoyético, el corazón, los riñones y el sistema músculoesquelético. En la **Tabla 6** se resumen brevemente este tipo de manifestaciones:

Tabla 6: Manifestaciones extrapulmonares

Síndromes	Manifestaciones
Cutáneos	Erupción eritematosa vesicular o papular. Síndrome de Stevens-Johnson
Neurológicos	Meningoencefalitis Parálisis nervios craneales o ascendente (síndrome de Guillain-Barré) Neuritis óptica Ataxia y psicosis
Cardíacos	Pericarditis Miocarditis Derrame pericárdico
Articulares	Mialgias, artralgias y poliartropatías. Artritis séptica (hipogammaglobulinemia) Rabdomiolisis
Hematológicos	Anemia hemolítica por crioaglutininas Púrpura trombótica trombocitopénica

Renales	Glomerulonefritis Nefropatía IgA Nefritis tubulointersticial
Gastrointestinales	Vómitos Diarrea Hepatitis colestásica Pancreatitis
Otras manifestaciones	Otitis externa, otitis media, miringitis Conjuntivitis, uveítis anterior, retinitis y neuritis óptica Abscesos tubo-ováricos

1. Síndromes cutáneos: los trastornos dermatológicos son una manifestación relativamente frecuente en la infección por *M. pneumoniae*, incluyendo urticaria, púrpura anafilactoide, eritema multiforme o síndrome de Stevens-Johnson (SSJ), entre otros. El SSJ grave aparece en forma de ampollas a tensión distribuidas por la piel, particularmente en extremidades distales, ingles y genitales, y con afectación de mucosas de orofaringe y ojos. En una revisión retrospectiva de la Clínica Mayo de los casos de SSJ grave durante 7 años, en seis de ellos se detectó una infección por *M. pneumoniae* concomitante. Dado que los síntomas respiratorios no siempre están presentes, la detección de esta bacteria debe estar incluida en el diagnóstico diferencial de esta patología (75). También se ha descrito la posible relación entre *M. pneumoniae* y el eritema multiforme ampoloso, aunque los estudios realizados tienen resultados contradictorios.

El fenómeno de Raynaud es otra de las entidades descritas relacionado con las infecciones por *M. pneumoniae*. Se trata de un trastorno vasoespástico que se caracteriza por un blanqueamiento de los dedos de pies y/o manos tras la exposición al frío, el cual va seguido de cianosis extrema y posteriormente rubefacción cuando se vuelven a calentar las extremidades. Este fenómeno es más frecuente en mujeres, y frecuentemente en pacientes con trastornos reumatológicos.

2. Síndromes neurológicos: son los más relevantes, estando presentes hasta en un 6% de los pacientes hospitalizados por infección por *M. pneumoniae*. La afectación puede darse en el cerebro, meninges, médula espinal o nervios periféricos, en forma de encefalitis, meningitis aséptica, mielitis transversa, accidente cerebrovascular y radiculopatía.

La manifestación cerebral más frecuente es la encefalitis, especialmente en niños, pudiendo no ir asociada a clínica respiratoria. La clínica tiene diferente origen en función del momento de presentación, estando directamente relacionada con la propia infección si la presentación es temprana (PCR *M. pneumoniae* en LCR positiva), o con la producción de anticuerpos antigangliósido en la aparición tardía (PCR negativa), generados por reacción cruzada con los glucolípidos bacterianos (76).

En ocasiones, el daño vascular puede provocar infarto cerebral, necrosis estriatal o desórdenes psicológicos, así como la disfunción cerebelar por causas autoinmunitarias. El síndrome de Guillain-Barré es una complicación ocasional provocada por la producción de autoanticuerpos antigangliósido y antigalactocerebrósido, tal como ocurre en las neuropatías. A pesar de que se han descrito pacientes con estas patologías en los que se ha detectado la bacteria en muestra de líquido cefalorraquídeo, muchas de estas entidades son difíciles de diagnosticar porque el uso de inmunoglobulinas para su tratamiento interfiere con la posterior realización de una serología en la fase de convalecencia.

Otros cuadros incluyen una afectación y disfunción del tronco del encéfalo, como la encefalitis de Bickerstaff y de síndrome de Miller Fisher, asociados con ataxia y oftalmoplejía. Ambos síndromes muestran hiperproteínorraquia sin pleocitosis y al aumento de las concentraciones de anticuerpo anti-CQ1b, respondiendo a los corticoides, plasmaféresis o tratamiento con inmunoglobulina.

Dado que este tipo de manifestaciones puede darse en presencia o no de sintomatología respiratoria, y pueden deberse a mecanismos inmunológicos más que a la propia invasión bacteriana (por lo que las pruebas moleculares arrojan resultados negativos), la seroconversión puede aportar un diagnóstico más preciso en estos casos.

3. Síndromes cardíacos: el papel de *M. pneumoniae* en la pericarditis, miocarditis, taponamiento cardíaco y endocarditis no es frecuente, pero está bien documentado, y sus efectos van desde cuadros asintomáticos hasta infecciones fatales. La enfermedad parece estar relacionada con la detección directa del microorganismo en el tejido cardíaco afectado, por medios convencionales o moleculares.

En el caso de las miocarditis, se considera una causa autoinmune, ya que en muchos de los pacientes no se han evidenciado cuadros de neumonía concurrentes (77).

4. Síndromes articulares: las mialgias y artralgias son el síntoma más común en pacientes con infección por *M. pneumoniae*, apareciendo hasta en un 45% de casos (78). La artritis séptica por migración de la bacteria a las articulaciones es característica en pacientes con hipogammaglobulinemia, mientras que el origen autoinmune es habitual en pacientes inmunocompetentes, normalmente asociada a un cuadro respiratorio. Otra de las manifestaciones descritas es la rabdomiolisis aguda, cuyo origen parece ser una combinación de la invasión bacteriana directa, los procesos autoinmunitarios y la oclusión vascular (46).

5. Síndromes hematológicos: al inicio o durante la primera semana de enfermedad, se pueden generar crioaglutininas, autoanticuerpos de tipo IgM contra el antígeno I de los hematíes, uniéndose a temperaturas inferiores a la temperatura corporal y causando una hemólisis de estos. Ocasionalmente, sus niveles pueden ser lo suficientemente altos para desencadenar anemia hemolítica, la cual puede ser muy grave en pacientes con anemia drepanocítica. Otras complicaciones incluyen la trombopenia o trombocitosis, púrpura trombótica trombocitopénica, pancitopenia o coagulación intravascular diseminada (46, 78).

6. Síndromes renales: las complicaciones renales pueden tener gran importancia por poder desencadenar en fallo renal. Entre ellas encontramos glomerulonefritis aguda, síndrome nefrótico, nefritis intersticial o nefropatía IgA, y aunque parecen ser resultado de la formación de inmunocomplejos, existen diversos casos descritos en los que la propia bacteria se ha detectado en tejido renal (46).

7. Síndromes gastrointestinales: diversos síntomas gastrointestinales se presentan de forma frecuente junto a la infección respiratoria, pero la evidencia sobre si están relacionados con la misma es escasa. Se ha descrito algún caso de hepatitis con fallo hepático grave y la pancreatitis. Se postula que la disfunción hepática temprana estaría relacionada con la inflamación producida por la propia infección, mientras que la tardía estaría mediada por autoinmunidad, daño vascular o mecanismos yatrogénicos (77).

8. Otras manifestaciones: otros síntomas incluyen los oculares, como conjuntivitis, uveítis e iritis, que parecen de origen autoinmune dado que no hay casos reportados en los

que se haya detectado el microorganismo en tejido ocular (77). Hasta un tercio de los pacientes tienen síntomas óticos, tales como otitis externa, otitis media o miringitis. *M. pneumoniae* ha sido aislado también del tracto urogenital de hombres y mujeres, incluyendo un absceso tubo-ovárico (28).

Dada la aparente capacidad de la bacteria de pasar al torrente sanguíneo, las infecciones a cualquier nivel son posibles.

Todas estas entidades se pueden presentar de forma individual o conjunta, causando, incluso, la muerte del paciente. Dado que muchos de estos cuadros tienen origen autoinmune, el diagnóstico de la infección debe incluir tanto el diagnóstico indirecto por serología (de fase aguda y de convalecencia) como el diagnóstico directo basado en métodos moleculares y/o cultivo (en los casos que sea posible). Además, el uso de antibióticos favorecería la evolución en caso de que el cuadro estuviese mediado directamente por la bacteria y el efecto antiinflamatorio de algunas sustancias, como los macrólidos, podría ser beneficioso para neutralizar la exacerbada respuesta inmune.

1.3. *Mycoplasma genitalium*

En los años setenta se realizaron diversos estudios en pacientes que presentaban uretritis no gonocócica (UNG), en los que se constató que algunos de ellos respondían adecuadamente al tratamiento con tetraciclinas a pesar de no existir un patógeno bacteriano demostrado en su cuadro clínico. Por otro lado, en la microscopía de campo oscuro de pacientes infectados por diversos agentes, como clamidias, ureaplasmas, *M. hominis* y otros microorganismos, se observaban formas espirales móviles diferentes a *Treponema pallidum*, pero que recordaban a los organismos pertenecientes al género *Spiroplasma*, que habitualmente afectaban a animales y plantas.

En este contexto, se pensó que quizá podía tratarse de una nueva especie de este género que afectase al ser humano. En 1981, el Dr. Taylor-Robinson se encargó personalmente de llevar 13 muestras de pacientes visitados en el St. Mary's Hospital (Londres) con diagnóstico de UNG al laboratorio del Dr. Tully en el National Institutes of Health en Bethesda (Maryland), que tenía cierta experiencia en el cultivo de espiroplasmas y micoplasmas. La sorpresa surgió cuando, tras un mes de incubación en medio SP4 a 37°C, no crecieron los esperados espiroplasmas, sino que en dos de las trece muestras se aisló un micoplasma fermentador de glucosa (cepas G37 y M30), que resultaron ser similares entre sí, pero serológicamente diferentes a los micoplasmas descritos hasta el momento. Fue entonces cuando se propuso que ambas cepas correspondían a una nueva especie,

denominada *Mycoplasma genitalium*, la undécima especie de origen humano descrita en este género (79).

Tras su descubrimiento, se diseñaron múltiples estudios para conseguir de nuevo el aislamiento de la bacteria en cultivo, pero su éxito fue variable. No fue hasta casi 10 años después cuando se desarrollaron nuevas técnicas sensibles y fiables para la detección de *M. genitalium*.

1.3.1. Características celulares

Mycoplasma genitalium es el más pequeño de todos los *Mollicutes*, con un genoma de tan solo 580.000 pares de bases de longitud (menos de 500 genes), que parece ser el conjunto mínimo necesario para un microorganismo de vida libre. Por esta razón, su genoma fue uno de los primeros en secuenciarse por completo y reconstruirse totalmente *in vitro* (80, 81) y se acerca al concepto de “célula mínima” (mínimo contenido genómico necesario y suficiente para un organismo de vida libre) (82).

Su genoma es rico en guanina y citosina (G+C 32%, menor que *M. pneumoniae* que posee un 39%), es capaz de metabolizar la glucosa, pero no la urea ni la arginina, y su crecimiento lento se acelera con la repetición de subcultivos. En cultivo, puede dar lugar a colonias con morfología parecida a la de “huevo frito” de *M. pneumoniae* en atmósfera de nitrógeno con un 5% de CO₂.

Por microscopía electrónica, la bacteria presenta forma de botella con una estructura cilíndrica terminal truncada, y puede adherirse tanto a superficies de cristal y plástico como a células humanas (invasión de células epiteliales incluyendo localización nuclear) mediante una adhesina denominada MgPa (también denominada MG191) de 140 kDa.

La estructura terminal contiene al menos otras 6 proteínas accesorias, como P110 (MG192), que junto a MgPa, es indispensable para la adherencia, además de MG218 y MG317. La bacteria es móvil, y parece que la estructura terminal participa en su desplazamiento (*gliding motility*), movilizándose en primer lugar.

Presenta un tamaño de 0.6-0.7µM de largo por 0.3-0.4µM de ancho, que se reducen a 0.06-0.07µM en la estructura terminal. Su membrana celular está formada por 3 capas, y tal como ocurre con el resto de micoplasmas, al carecer de pared celular, es resistente a antibióticos betalactámicos y sensible a otros grupos como tetraciclinas, macrólidos o quinolonas.

A pesar de sus similitudes estructurales y antigénicas con *M. pneumoniae*, presenta un genoma marcadamente más reducido (580 kb vs 816 kb), con menor contenido G+C, y la secuenciación del mismo reveló que todos los marcos abiertos de lectura (en inglés *open reading frames* – ORFs) están presentes también en el genoma de *M. pneumoniae*. En cuanto a las adhesinas de ambos, la proteína MgPa presenta una homología de un 48% respecto a la adhesina P1 de *M. pneumoniae*.

De forma similar a *M. pneumoniae*, su replicación es por fisión binaria.

Respecto a los factores que influyen en su patogenicidad, además de los generales mencionados anteriormente, podemos destacar algunas características propias de esta bacteria. En su adhesión a las células a infectar participa un complejo proteico que incluye la proteína MgPa, uniéndose de esta forma a células epiteliales, hematíes (hemadsorción), espermatozoides o células Vero o Hep-2, así como a superficies de cristal o plástico.

Su reducido genoma codifica proteínas específicas implicadas en el *gliding motility*, lo que hace pensar que este proceso debe estar directamente relacionado con su patogenicidad. Una hipótesis es que la motilidad facilitaría su penetración a través de la mucosa para la invasión de las células epiteliales, en las que una vez adherido, entraría de forma similar a *C. trachomatis* por endocitosis mediada por receptor a través de vesículas de clatrina. De esta forma, en el interior de la célula quedaría protegido de la acción del sistema inmune y los antibióticos, permitiendo el desarrollo de infecciones latentes o crónicas.

A pesar de no estar demostrada su capacidad de producción de toxinas (a diferencia de su homólogo *M. pneumoniae*), posee una nucleasa de membrana dependiente de calcio que degrada los ácidos nucleicos del hospedador para utilizarlos como precursores de crecimiento y procesos patogénicos.

M. genitalium produce una respuesta inflamatoria aguda mediada por leucocitos polimorfonucleares, pero se desconoce si ésta pudiera ser similar a la de *M. pneumoniae*, provocando daño celular o autoinmunidad, o si el haber padecido una infección previa por este último generará una respuesta inmune exagerada en una infección posterior por *M. genitalium*. Diversos estudios han corroborado que, a pesar de compartir diversos antígenos de superficie, los anticuerpos de una especie no proporcionan protección cruzada frente a la otra (83).

Otra de las preguntas sin respuesta es si los tratamientos hormonales previos del hospedador podrían actuar como facilitadores de la colonización por *M. genitalium* al

estimular determinados receptores celulares, pero hasta el momento no existen resultados concluyentes.

1.3.2. Epidemiología

Mycoplasma genitalium es un patógeno de transmisión sexual directamente relacionado con cuadros de uretritis no gonocócica (UNG) y con mayor evidencia en casos de uretritis no producida por gonococo ni clamidia (UNGNC), en los que representa entre un 10-35% de casos en los grupos poblacionales de mayor riesgo, como son los HSH o pacientes que acuden a clínicas de salud sexual.

Su transmisión es por contacto directo entre mucosas. Al no ser de declaración obligatoria, existen pocos datos en población general, ya que los estudios de prevalencia están focalizados a grupos poblacionales concretos.

En nuestro país, solo existe un estudio sobre la prevalencia de este microorganismo en población de alto y bajo riesgo, en el que detectaron una prevalencia de *M. genitalium* del 3,7% (84). El resto de información disponible se centra en subgrupos como los HSH y la presencia de cepas resistentes a macrólidos.

En Estados Unidos se realizó una revisión de 40 estudios independientes de mujeres en poblaciones de bajo y alto riesgo, encontrando una prevalencia del 2% y 7.3%, respectivamente (85). En 2019, otro estudio realizado por Manhart et al., incluyó 3300 participantes (sintomáticos y asintomáticos), de los cuales 1737 eran mujeres (edad media 33 años) y 1563 eran hombres (edad media 29 años), 61% afroamericanos y 43.2% de la zona sudeste de Estados Unidos, reportando una prevalencia del 10.3% (86).

El metaanálisis realizado por Baumann et al. sobre la prevalencia de *M. genitalium* en diferentes grupos de población y distribución geográfica mundial concuerda con los datos del estudio previo. Se estimó una prevalencia de 1.3% en individuos de 16 a 44 años sin diferencias estadísticas entre ambos sexos en países desarrollados, valor que asciende a 3.9% en países en desarrollo. En los diferentes subgrupos estudiados, se observó una prevalencia de 0.9% en gestantes, mientras que en el colectivo de HSH oscilaba entre un 3.2-3.7% en función de si la muestra provenía de la comunidad o de una clínica de salud sexual. Los valores se incrementan en caso de mujeres trabajadoras del sexo, en las que la prevalencia va desde el 13.2% y un 26.3% en función de si las muestras provenían de la comunidad o de clínica especializada (87).

1.3.3. Síndromes clínicos

La evidencia es sólida en cuanto a la clasificación de *Mycoplasma genitalium* como un patógeno del tracto genitourinario. Respecto a las infecciones a nivel sistémico, no existen estudios dada la dificultad para su cultivo *in vitro*. A continuación, haremos un repaso por los diferentes síndromes clínicos que puede causar esta bacteria, agrupándolos por el grupo de pacientes en el que se producen.

1.3.3.1 En hombres

Uretritis no gonocócica

Es la segunda causa de UNG aguda tras *C. trachomatis*, produciendo ambos microorganismos una sintomatología más leve que en la causada por *N. gonorrhoeae*. Se ha detectado *M. genitalium* en el 15-25% de pacientes con UNG sintomática, respecto a un 5-10% en pacientes sin patología, y la carga bacteriana detectada por técnicas moleculares es significativamente mayor en pacientes sintomáticos (79).

La asociación con UNGNC es aún más potente, detectando *M. genitalium* en hasta un tercio de estos pacientes, lo que constata el papel propio de esta bacteria en la uretritis, incluso de forma independiente a los patógenos habituales.

M. genitalium es responsable también de una gran proporción de cuadros crónicos y recurrentes de uretritis. Su persistencia de hasta en un 40% de casos en hombres con UNGNC crónica, viene dada por el fallo de erradicación de la bacteria por tetraciclinas (y más recientemente por azitromicina), y por su localización intracelular, la cual le protege de la acción tanto del sistema inmune como de la terapia antibiótica (79).

Proctitis

El papel etiológico de *M. genitalium* en la proctitis es discutido. Se han realizado diversos estudios sobre este tópico, sin conseguir obtener una respuesta clara. Soni et al. realizaron un estudio en el que no encontraron asociación entre la detección rectal de *M. genitalium* y la presencia de síntomas (88) y Francis et al. solo encontraron una asociación débil (89). Bissessor et al. describieron que la carga bacteriana de *M. genitalium* era mayor en pacientes HSH con clínica de proctitis que en aquellos asintomáticos, y, entre ellos, mayor en los infectados por VIH (90). Read et al. tampoco encontraron una evidencia significativa entre la detección de *M. genitalium* y la presencia de sintomatología, destacando que el 84% de las infecciones estaban causadas por cepas resistentes a macrólidos (91). A pesar de esto, y dado que las infecciones asintomáticas no requieren tratamiento, las guías actuales recomiendan la búsqueda de *M. genitalium* únicamente en aquellos casos de

proctitis en los que se han excluido *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* como agentes etiológicos (92).

Balanopostitis

La inflamación del glande (balanitis) junto con la inflamación del prepucio (postitis) se dan de habitualmente de manera conjunta, y se han asociado de manera significativa con *M. genitalium* en un estudio (93).

Prostatitis crónica

No existe evidencia suficiente para considerar a *M. genitalium* agente etiológico en los cuadros de prostatitis. Solamente se ha evidenciado su presencia en muestras prostáticas en dos estudios (94, 95), en los que la cantidad de pacientes positivos era muy escasa, por lo que las guías más actuales ya no mencionan esta patología.

Epididimitis aguda

La epididimitis aguda es una infección complicada que podría estar causada por *M. genitalium*, dada su detección durante un ensayo clínico de un antibiótico en pacientes con esta patología (96). Por analogía con *C. trachomatis*, etiología claramente establecida en este cuadro, *M. genitalium* podría producirlo también, por lo que el estudio de fluido epididimal junto a orina o exudado uretral debe realizarse en los casos sospechosos (97).

1.3.3.2 En mujeres

Uretritis no gonocócica

Diversos estudios sobre mujeres que acuden a clínicas de salud sexual muestran una asociación positiva entre *M. genitalium* y uretritis. En los países nórdicos, es habitual el estudio de exudado uretral también en mujeres, pero dado que el número de casos es significativamente menor que en hombres, es necesaria la realización de más estudios para confirmar si *M. genitalium* causa síndrome uretral (disuria y frecuencia miccional en mujeres con orina estéril) o piuria sintomática o asintomática (79, 98).

Vaginosis bacteriana y vaginitis

Así como *M. hominis* está implicado en cuadros de vaginosis bacteriana, el papel de *M. genitalium* no está demostrado en la actualidad. A pesar de haberse detectado por técnicas moleculares a nivel vaginal, los resultados de los estudios son discordantes. Dado que *M. genitalium* es capaz de infectar *in vitro* células vaginales y causar cuadros inflamatorios como la balanopostitis (a diferencia de *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis*), su implicación debe estudiarse en profundidad (79).

Cervicitis

No existe un criterio estándar en la definición de cervicitis. A nivel clínico, signos como el exudado mucopurulento, friabilidad cervical, eritema y sangrado tras la toma son altamente sugestivos, pero muchos autores consideran necesaria la presencia de leucocitos polimorfonucleares (PMN) en exudado cervical en cantidades variables (>10 o >30, según diferentes trabajos) (79). Tras los estudios realizado por Moi et al. (98) y el metaanálisis de Lis et al. (99), la última guía europea recoge la cervicitis como una de las manifestaciones clínicas de *M. genitalium* en mujeres (92).

Enfermedad inflamatoria pélvica

La enfermedad inflamatoria pélvica (EIP) está considerada una de las principales complicaciones de la infección por *M. genitalium*. Este cuadro incluye la endometritis (infección del útero) y/o salpingitis (infección en las trompas de Falopio). La laparoscopia se considera la técnica de referencia para su diagnóstico, pero al ser una técnica invasiva no se hace de forma rutinaria, sino que en muchas ocasiones el estudio de una muestra endocervical es empleado para el diagnóstico. Múltiples estudios respecto a la implicación de *M. genitalium* en este cuadro se han llevado a cabo (79), y tal como ocurre en la cervicitis, el metaanálisis de Lis et al. (99) mostró una asociación positiva entre la infección por *M. genitalium* y EIP, evidenciando el doble de riesgo de padecer EIP en los casos en que *M. genitalium* es detectado (odds ratio de 2.14[95% IC, 1.31–3.49]). Este valor ascendía a 2.73 (95% IC, 1.60–4.66) si se excluían los estudios que incluían serología como método diagnóstico.

Patología en la reproducción

Tal como ocurre en la enfermedad inflamatoria pélvica, el riesgo de parto pretérmino o de aborto espontáneo es dos veces mayor en las pacientes infectadas por *M. genitalium* (99). Estos eventos están causados por múltiples etiologías, y los microorganismos suponen solo una pequeña parte de estas. Dado que la prevalencia de *M. genitalium* es baja, no es coste-efectiva su detección rutinaria en las gestantes (quizá podría plantearse en mujeres con alto riesgo, con infecciones de transmisión sexual - ITS previas o múltiples parejas), ni se ha demostrado aún que el tratamiento disminuya los casos de parto pretérmino o aborto espontáneo.

1.3.3.3 *En ambos géneros*

Infertilidad

Se han realizado múltiples trabajos dirigidos a comprobar si la infección por MG podría causar infertilidad. Los datos obtenidos son discordantes, y aunque todo parece indicar que esta bacteria está relacionada con el cuadro, se requieren más estudios para verificar este hecho (79, 99).

1.3.3.4 *Manifestaciones extragenitales*

Otra de las posibles manifestaciones es la artritis reactiva adquirida por vía sexual (SARA – *sexually acquired reactive arthritis*), en la que se observan cuadros de artritis aséptica en pacientes que padecen o han padecido recientemente UNG. Este cuadro puede ir acompañado por conjuntivitis, constituyendo la triada clásica del síndrome de Reiter, y es más frecuente en hombres. Aunque los estudios indican una diseminación hematógena de la bacteria (tal como ocurre en *M. pneumoniae*), los resultados no son concluyentes y se requieren más trabajos en esta línea (79).

1.3.3.5 *Influencia en la transmisión del VIH*

Tal como ocurre en otras ITS, *M. genitalium* podría tener un papel relevante en la adquisición y transmisión del VIH. Esta teoría surgió en 1990, año en que *M. genitalium* fue identificado en la sangre de un paciente con SIDA. Desde entonces, se han llevado a cabo múltiples estudios que muestran una posible relación causal. En la infección por *M. genitalium* se produce una respuesta inflamatoria con disrupción de mucosas, lo que podría aumentar la susceptibilidad o transmisibilidad del VIH. Además, *M. genitalium* puede

incrementar el efecto citopático causado por el VIH, estimulando la replicación viral (por tanto, acelerando la evolución de la enfermedad) con el consiguiente aumento de transmisibilidad. Otra de las posibilidades es que la adherencia de *M. genitalium* a los linfocitos infectados por HIV podría estimular la liberación o multiplicación viral (100).

La mayoría de los estudios sobre este hecho están realizados en la cohorte de hombres HSH o en el África subsahariana (101, 102).

1.4. Diagnóstico microbiológico de las infecciones causadas por *M. pneumoniae* y *M. genitalium*

El diagnóstico microbiológico de las infecciones causadas por *M. pneumoniae* y *M. genitalium* puede abordarse en conjunto a pesar de las particularidades concretas de cada especie y la patología causada.

En el caso de *M. pneumoniae*, tanto por el tipo de clínica que produce como por sus características propias, disponemos de un mayor abanico de herramientas que pueden contribuir a su diagnóstico. Además de la sospecha clínica, poseemos no solo pruebas propias del laboratorio de microbiología, sino una serie de determinaciones complementarias muy útiles en el diagnóstico de los cuadros neumónicos. Por el contrario, en *M. genitalium* el diagnóstico se restringe fundamentalmente a las pruebas moleculares.

Veamos en detalle las opciones diagnósticas para una u otra especie:

Sospecha clínica

En el caso de *M. pneumoniae*, dado que es una enfermedad relativamente frecuente en niños y adultos jóvenes, se debe sospechar su presencia en aquellos cuadros respiratorios de vías altas, y en adultos, especialmente en los que no han respondido a tratamiento previo con antibióticos betalactámicos. Otro indicio de esta infección es la tos persistente refractaria al tratamiento, o los cuadros de neumonía que no producen ninguna alteración radiológica significativa, especialmente en pacientes inmunodeprimidos.

En *M. genitalium*, la sintomatología es similar a la producida por *C. trachomatis*, pero, a diferencia de la anterior, los criterios de a quién se le debe hacer el diagnóstico están restringidos. Al tratarse de un microorganismo altamente susceptible a la generación de resistencias antibióticas, el consenso general es realizar únicamente su diagnóstico (y, por tanto, su consiguiente tratamiento) a aquellos pacientes sintomáticos con el fin de evitar tratamientos innecesarios que pudiesen llevar a la generación de cepas resistentes. En la

Tabla 7 se recogen las principales indicaciones diagnósticas reflejadas en la Guía Europea para el manejo de las infecciones causadas por *M. genitalium* (92):

Tabla 7: Recomendaciones diagnósticas en *M. genitalium*.

Adaptada de: Jensen JS, Cusini M, Gomberg M, Moi H, Wilson J, Unemo M. 2021 European guideline on the management of *Mycoplasma genitalium* infections. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV. 2022.

Recomendación	Grado de evidencia
Indicaciones para testar <i>M. genitalium</i>	
Hombres <ul style="list-style-type: none"> • Síntomas o signos de uretritis • Epididimo-orquitis aguda en <50 años • Proctitis tras excluir NG y CT 	1B
Mujeres <ul style="list-style-type: none"> • Cervicitis mucopurulenta • Sangrado intermenstrual o post-coital • Disuria de etiología desconocida • Dolor pélvico agudo y/o EIP • Proctitis tras excluir NG y CT 	1B
Contactos sexuales de pacientes positivos	1B
Test previo al fin del embarazo	2B
Todos los test de <i>M. genitalium</i> deben ir seguidos de un ensayo capaz de detectar resistencia a macrólidos	1B
Detección de resistencia a quinolonas no está indicada de rutina, pero sí tras fracaso terapéutico con moxifloxacino	1D
Muestras clínicas	
Primer chorro de orina en hombres y exudado vaginal en mujeres son muestras adecuadas y pueden ser recogidas por autotoma	1B
Muestras rectales solo en proctitis en las que se han excluido NG/CT	1D
Testar muestras orofaríngeas no está recomendado	1D
Especial control del medio de transporte y procedimiento de extracción de ácidos nucleicos	1C

NG: *Neisseria gonorrhoeae*, CT: *Chlamydia trachomatis*, EIP: enfermedad inflamatoria pélvica

Pruebas complementarias

Además de las técnicas microbiológicas *per se*, existen diversas pruebas complementarias que nos pueden ayudar en el diagnóstico de las infecciones causadas por *M. pneumoniae*:

- **Hemograma:** aproximadamente un tercio de los pacientes presentan una leucocitosis moderada, una velocidad de sedimentación globular (VSG) elevada y en aquellos pacientes que desarrollen una anemia hemolítica, esta también se podrá visualizar.

- Crioaglutininas: históricamente, y antes de que apareciesen muchas de las técnicas diagnósticas disponibles hoy en día, la presencia de crioaglutininas era de alta utilidad en el diagnóstico de la neumonía atípica primaria, la cual era también conocida como “enfermedad de las aglutininas frías”. Esta determinación se podía realizar extrayendo sangre en un tubo con anticoagulante e introduciendo el tubo en agua con hielo durante 30 segundos. En caso de presencia de crioaglutininas, al inclinar el tubo se observarían coágulos, que revertían al subir la temperatura. Otro método más estandarizado era la determinación de su presencia por un ensayo de inmunoenzimología (ELISA). El problema es que la presencia de este tipo de anticuerpos es inespecífica (aparecen en otras enfermedades bacterianas o virales) y que solo están presentes en un 50% de pacientes, lo que hace que únicamente se recomiende su uso en casos de muy alta sospecha diagnóstica.
- Radiología: la presentación radiológica de la neumonía atípica primaria es muy variable y similar a otras patologías respiratorias. La respuesta inflamatoria a la infección causa un infiltrado mononuclear que en la radiografía se observa difuso, en zonas perihiliares o lóbulos inferiores, con adenopatía hiliar y distribución unilateral (solo un 20% de casos presentan afectación bilateral).
- Anatomía patológica: en los casos en los que *M. pneumoniae* causa la muerte, el estudio post-mortem revela lesiones en el epitelio de las mucosas con ulceración y destrucción ciliar, así como edema bronquial, infiltrados alveolares y bronquiolitis obliterante. En casos muy severos se observó derrame pleural difuso o abscesos pulmonares. Los mecanismos que causan estas alteraciones son principalmente tres: la adhesión bacteriana en el epitelio respiratorio a través de los receptores de ácido siálico con el orgánulo de adhesión, que lesionaría directamente el epitelio y la actividad de los cilios; la toxina CARDS, que dañaría directamente el tracto respiratorio y provocaría un daño indirecto al desencadenar una respuesta inflamatoria potente; y en último lugar, la producción de autoanticuerpos por la alteración de las proteínas de la superficie de las células a las que se une la bacteria.

Recogida de muestras para el diagnóstico

Para el diagnóstico microbiológico de *M. pneumoniae* a través de cultivo o técnicas moleculares, las muestras adecuadas incluyen los frotis nasofaríngeos u orofaríngeos, así como la mayoría de las especímenes con origen en las vías respiratorias bajas (aspirados

traqueales, esputo, lavado broncoalveolar-BAL, biopsia pulmonar o líquido pleural). Entre ellas, el esputo es, por consenso en la mayoría de los estudios, la mejor muestra (78), dado que parece contener mayor cantidad de microorganismo que otras muestras, como el BAL. A pesar de ello, lo más común es la obtención de muestras de exudado faríngeo/nasofaríngeo por su simplicidad y porque en muchos casos, la patología respiratoria es “seca”, sin posibilidad de recolección de secreciones sin el uso de técnicas invasivas. En el caso de las infecciones con manifestaciones extrapulmonares, muestras como sangre, líquido cefalorraquídeo, biopsia de piel o tejido de cualquier órgano y líquido pericárdico son totalmente aptas para el proceso.

En el caso de *M. genitalium*, durante años se defendió la utilización de muestras “de calidad” para el diagnóstico de las infecciones en mujeres, como son los exudados endocervicales, pero con el tiempo se ha comprobado que los exudados vaginales (incluso recogidos por la misma paciente) proporcionan resultados óptimos dada la alta sensibilidad de las técnicas empleadas. En los hombres, tanto la orina de la primera parte de la micción como los exudados uretrales o frotis rectales, en los casos de proctitis sin detección de *N. gonorrhoeae* (NG) y *C. trachomatis* (CT), son útiles para el diagnóstico.

Independientemente del tipo de muestra escogido, un factor clave es su correcto transporte y conservación, con un medio (ya sea SP-4 o medio universal de transporte sin antibiótico que inhiba el crecimiento) que evite la desecación y conserve la viabilidad de la bacteria (en caso de solicitar cultivo) y de su material genético para su posterior detección por técnicas de amplificación genómica. Los escobillones deben ser de Dacron o polyester, nunca de alginato o algodón, porque estos últimos inhiben las pruebas moleculares. Una vez recibidas en el laboratorio, se pueden conservar refrigeradas durante un tiempo limitado o congeladas a -80°C para asegurar la estabilidad tanto para técnicas moleculares como para cultivo.

Cultivo

Los micoplasmas requieren medios de cultivo complejos, que contengan esteroides, aminoácidos, ácidos grasos y otros componentes que cumplan con sus requerimientos nutricionales. Las distintas especies se diferencian por su capacidad de fermentar la glucosa, el uso de la arginina o la hidrólisis de urea. Los medios de cultivo (ya sean sólidos o caldos) incluyen en su composición caldo infusión cerebro-corazón, peptona, extracto de levadura, suero (bovino fetal, o de caballo), suplementos de aminoácidos, algún metabolito (glucosa, arginina o urea, en función de la especie buscada) y rojo fenol como indicador de

pH. El más utilizado es el comercializado SP-4, ya sea en formato líquido o agar, desarrollado por Tully et al. (103), y compuesto por caldo infusión cerebro-corazón, peptona, extracto de levadura, suero bovino fetal, varios suplementos (CMRL), antibióticos (para inhibir la contaminación acompañante), glucosa (como metabolito) y rojo fenol como indicador del pH.

Como medio sólido, además del agar SP-4, también existe el agar modificado de Hayflicks o el agar diferencial A7 (para micoplasmas genitales). También se dispone de un medio bifásico (agar y caldo) comercializado (Mycotrim, Irving Scientific). En caso de preparación casera en el laboratorio de microbiología, se deben realizar controles de calidad de cada uno de los componentes y controles de cada nuevo lote preparado con cepas patrón o cepas de aislados clínicos con pocos pases.

- *Mycoplasma pneumoniae*

En el caso de *M. pneumoniae*, su cultivo requiere un nivel de bioseguridad de tipo 2 (cabina de flujo laminar, por el riesgo de generación de aerosoles). Su detección en medio líquido SP4 se basa en su capacidad de hidrólisis de la glucosa, la cual acidificará el medio y producirá un cambio colorimétrico del indicador de pH, pasando de fucsia a naranja, y posteriormente a amarillo, sin ningún tipo de turbidez. Los caldos de cultivo se pueden incubar a 37°C y sin requerimientos especiales, pero el crecimiento en medio sólido se ve favorecido por la incubación en presencia de CO₂ al 5% y con las placas selladas para evitar la desecación del agar.

Tanto la muestra original como los positivos o pases ciegos de medio líquido, deben inocularse también en placa de agar para poder observar con estereomicroscopio el crecimiento de pequeñas colonias esféricas de hasta 100µm de diámetro con apariencia de “huevo frito” (por tener la parte central elevada y la periferia hundida, al estar incrustada en el agar) tras un periodo de 3-4 semanas.

Tanto los cambios colorimétricos en medio líquido como la morfología de las colonias en agar corresponden con una identificación presuntiva de *M. pneumoniae*, pero para confirmarlo se deben realizar pruebas adicionales, como la reducción del tetrazolio, la hemadsorción de eritrocitos de cobaya, inhibición con antisueros, o técnicas de inmunofluorescencia o PCR (104).

La sensibilidad del cultivo respecto a la PCR es de aproximadamente un 60%, incluso en los laboratorios con mayor experiencia. Su principal ventaja era el aislamiento de la cepa para la realización de estudios epidemiológicos o de caracterización biológica y molecular,

pero en la actualidad no es imprescindible dada la evolución de las técnicas moleculares y la disponibilidad de herramientas como la secuenciación de genomas completos (*Whole Genome Sequencing*).

A nivel diagnóstico, a pesar de que su especificidad es de un 100% siempre que se empleen los métodos adecuados para la identificación a nivel de especie, su interpretación, en caso de ser positivo, es compleja si se utiliza como prueba única, ya que la bacteria puede persistir en el paciente por periodos prolongados tras la infección aguda, en forma de portador asintomático. En caso de utilizarse como método diagnóstico, se debe complementar con algún otro tipo de prueba, como son la serología o las técnicas moleculares. El aislamiento de la bacteria en líquidos orgánicos teóricamente estériles sí que es valorable y confirmatorio de su papel etiológico.

Por los motivos expuestos anteriormente, la mayoría de los laboratorios de diagnóstico clínico optan por otros métodos diagnósticos más rápidos y sencillos, quedando el cultivo relegado a centros de referencia o a nivel de investigación.

- *Mycoplasma genitalium*

A pesar de que dentro del grupo de los micoplasmas genitales existen especies que se pueden cultivar, como *M. hominis* o los ureaplasmas, respecto a *M. genitalium*, el cultivo se realiza de forma excepcional en centros de investigación altamente especializados, dado que es extremadamente complejo y requiere líneas celulares Vero o incubaciones de varias semanas en medio SP4 para llevarlo a cabo, ya que su crecimiento es muy lento.



Figura 5: Cultivo de *M. genitalium* G37 en medio SP4. El crecimiento de la bacteria produce un viraje del color del medio a amarillo (tubo izquierdo) respecto a la tonalidad naranja del medio sin crecimiento (tubo derecho). Imagen cedida por la Dra. Chloé Le Roy, Universidad de Burdeos.

Técnicas de detección de antígeno

Las técnicas de detección de antígeno presentan baja sensibilidad (60-68%) y especificidad, dada las reacciones cruzadas con otras especies de micoplasmas y la similitud antigénica entre *M. pneumoniae* y *M. genitalium*, por lo que su utilidad y aceptación son limitadas.

En el caso de *M. pneumoniae*, existen varias técnicas como son la inmunofluorescencia directa, la contra-inmuno-electroforesis, el inmunoblot o los enzimoimmunoensayos, de los que el Pneumofast Ag (Internacional Microbio. Signes, France) ha sido el más utilizado. Su sensibilidad y especificidad, tomando como gold standard la serología, era bastante aceptable, pero la aparición de técnicas moleculares como la PCR ha hecho que la detección de antígenos haya quedado prácticamente en desuso.

Técnicas serológicas

La serología supone el método diagnóstico más ampliamente empleado en el diagnóstico de las infecciones por *M. pneumoniae*.

Sin embargo, en el caso de *M. genitalium* (y en el resto de micoplasmas urogenitales) no representa una alternativa válida. La ubicuidad de muchas de las especies hace que la interpretación de los títulos de anticuerpos sea compleja, ya que la existencia de estos (sin otra prueba complementaria positiva) no es significativa. Diversos métodos como inmunofluorescencia, enzimoimmunoanálisis, microinmunofluorescencia o métodos de inhibición metabólica para el diagnóstico de *M. genitalium*, *M. hominis* o *Ureaplasma* spp. fueron comercializados en su momento, pero cayeron en desuso por su baja utilidad comparada con las técnicas moleculares (105).

Para comprender el diagnóstico serológico de *M. pneumoniae* es necesario conocer la dinámica de la respuesta inmune a este tipo de infecciones. *M. pneumoniae* posee antígenos glucolipídicos y proteicos que provocan una respuesta inmune en el individuo afectado. El sistema inmune de los pacientes inmunocompetentes responde de manera rápida, consiguiéndose un pico de anticuerpos a las 3-6 semanas post-infección (en la primera semana IgM, que irá seguida de la producción de IgG en las dos semanas posteriores), y sus niveles irán bajando de forma progresiva a lo largo del tiempo (en un periodo de meses o incluso años).

Dado que los serotipos de *M. pneumoniae* van variando en las distintas olas epidémicas (lo que hace que los individuos puedan reinfectarse con las diferentes variantes), la detección de IgM es especialmente útil en la población pediátrica, en la que la probabilidad de exposición previa es relativamente menor que en la población adulta.

En los adultos infectados previamente, la respuesta inmune específica puede ser baja o carecer de IgM. Su ausencia no excluye la infección, ya que la respuesta a infecciones repetidas con el tiempo puede ser a expensas de anticuerpos tipo IgG. Por otro lado, el hecho de que la IgM esté presente no implica necesariamente que se trate de una infección aguda, ya que sus niveles pueden mantenerse altos durante largos periodos de tiempo y podrían corresponder a una infección previa.

Por tanto, el diagnóstico serológico de referencia se basa en la detección de seroconversión, es decir, del aumento de cuatro veces el título de anticuerpos entre la muestra obtenida en la fase aguda y la obtenida en la fase de convalecencia.

A lo largo del tiempo se han empleado diversas técnicas comerciales para la detección de anticuerpos (ver **Tabla 8**), las cuales revisaremos en detalle a continuación:

- Fijación del complemento (FC): fue una de las primeras técnicas empleadas en el diagnóstico serológico de *M. pneumoniae*. Empleaba como antígeno un extracto lipídico de *M. pneumoniae* o una suspensión de lisado bacteriano. Los resultados eran en muchas ocasiones inespecíficos, tanto por la complejidad antigénica de la bacteria como por reacciones cruzadas con otros micoplasmas. Esta técnica detecta tanto IgM como IgG, y el incremento en cuatro veces del título entre una muestra de fase aguda y una de fase de convalecencia o títulos superiores a 1/32, proporcionan una sensibilidad del 90% y una especificidad del 88%. Su complejidad y la gran cantidad de variables para controlar hizo que esta técnica fuese desplazada por otras opciones (106).
- Inmunofluorescencia (IF): son técnicas sencillas que permiten una cuantificación de los resultados. Su principal problema es que su lectura e interpretación son subjetivas y que algunas sustancias, como el factor reumatoide, pueden causar reactividad cruzada.
- Aglutinación: estas técnicas utilizan partículas, ya sean de látex, gelatina o eritrocitos (en este caso, hablaremos de hemaglutinación), como soporte para una suspensión antigénica de *M. pneumoniae*. Detectan conjuntamente IgM e IgG y también permiten su cuantificación. Son de fácil realización y elevada especificidad, aunque los mejores resultados se consiguen realizando la determinación pareada de dos muestras seriadas. En 2003, Templeton et al. reportaron que una muestra de suero del inicio de la infección permitía diagnosticar un 50% de las infecciones, y en caso de disponer de una muestra de la fase de convalecencia, la sensibilidad incrementaba hasta el 66%, siempre que se valorasen títulos $\geq 1/320$ (107).

- **Enzimoimmunoanálisis (EIA):** son las técnicas más ampliamente utilizadas en los laboratorios clínicos. Emplean una amplia variedad de preparados antigénicos (proteínas purificadas, mezcla de antígenos crudos, péptidos sintéticos, glucolípidos purificados) y su fundamento siempre es el mismo: el suero del paciente se incuba en una fase sólida, en la cual está fijado el antígeno. La unión de anticuerpos específicos se revelará con el uso de un conjugado (anti-anticuerpo marcado con un enzima) y su sustrato correspondiente. Presentan una buena sensibilidad y permiten la detección individual de IgM o IgG, se comercializan en diferentes formatos (membrana, microplacas, tiras de pocillos...), son automatizables y el volumen de muestra requerido es bajo. A pesar de ello, la utilización de una segunda muestra de la fase de convalecencia sigue siendo requerida para obtener una alta sensibilidad. Algunos estudios refieren la IgA como el mejor indicador de infección aguda, pero se ha visto que su especificidad es baja (108).

Tabla 8: Técnicas serológicas comerciales para la detección de anticuerpos frente a *M. pneumoniae*.

Adaptada de: Waites KB, Xiao L, Liu Y, Balish MF, Atkinson TP. *Mycoplasma pneumoniae* from the Respiratory Tract and Beyond. *Clinical microbiology reviews*. 2017;30(3):747-809.

Tipo de ensayo	Ac detectados	Equipamiento	Descripción	Ejemplos (referencias)
EIA	IgM/IgG	Espectrofotómetro	Placa de microtitulación con Ag absorbido en poliestireno y conjugado marcado enzimáticamente. Cuantitativo Requiere poco volumen de muestra (<100µL) Adaptable al volumen de trabajo	Inmunowell Mycoplasma IgM/IgG antibody (GenBio, San Diego, CA)
EIA de membrana	IgM/IgM+IgG	Ninguno	Membrana impregnada con antígeno, conjugado marcado enzimáticamente anti-IgG o IgM. Rápido	Inmunocard (Meridian Bioscience, Inc., Cincinnati, OH) <i>M. pneumoniae</i> IgG/IgM antibody test (Thermo Fisher, Lenexa, KS)
AP	IgM/IgG IgM+IgG	Ninguno	Partículas de látex/gelatina recubiertas de Ag, que en	SerodiaMyco II (FujirebioDiagnostics, Inc., Malvern, PA)

			presencia de Ac dan reacción visible. Cuantitativa (placa microtitulación) o cualitativa (tarjeta)	
IF	IgM/IgG	Microscopio de fluorescencia	Ag fijado a portaobjetos, conjugado específico anti-IgG/IgM. Cuantitativa. Lectura manual (subjetiva)	<i>Mycoplasma</i> antibody test system (Zeus Scientific, Inc., Branchburg, NJ)

Abreviaturas: Ag, antígeno; Ac, anticuerpo; EIA, enzimoimmunoanálisis; AP, aglutinación de partículas; IF, inmunofluorescencia

Con todos estos conceptos en mente, la selección de una técnica serológica está condicionada no solo por criterios funcionales (implantación en el flujo de trabajo del laboratorio, sensibilidad/especificidad, posibilidad de automatización...) sino que se debe tener en cuenta la dinámica de anticuerpos en esta infección y el tipo de población que debemos diagnosticar, ya que la sensibilidad diagnóstica podría variar. En niños pequeños, las técnicas que detectan IgM son claramente útiles, incluso empleándolas en muestra única. Esto facilita ampliamente el diagnóstico, ya que la patología producida en este grupo poblacional suele ser leve y en muchos casos se puede prescindir de una segunda analítica en la fase de convalecencia (109).

Técnicas moleculares

Los métodos moleculares son la técnica diagnóstica preferente en la actualidad para ambas especies de *Mycoplasma*. En el caso de *M. genitalium*, estas técnicas son de especial relevancia por ser las utilizadas de forma universal para el diagnóstico, ya que como hemos referido anteriormente, el cultivo es extremadamente complejo (requiere de líneas celulares para su realización) y la serología no es útil al presentar múltiples reacciones cruzadas con otros micoplasmas.

Mycoplasma pneumoniae

Los primeros estudios sobre métodos moleculares para la detección de *M. pneumoniae* datan de finales de los años ochenta, y desde entonces han evolucionado aportando mayor sensibilidad, rapidez (obtención del resultado en el mismo día) y posibilidad de aplicación en muestras con alto número de bacterias acompañantes (que en el cultivo impiden y/o enmascaran el crecimiento de *M. pneumoniae*). Por esta razón, se han convertido en el “nuevo gold standard” frente al cultivo, que era la técnica de referencia tradicional, pero su

complejidad ya descrita anteriormente ha hecho que las PCR lo hayan desbancado como referencia.

La muestra óptima para el diagnóstico por PCR es el esputo, aunque el exudado faríngeo o nasofaríngeo (este último con mayor número de inhibiciones que el faríngeo) son las más utilizadas ya que la tos presente en la neumonía por *M. pneumoniae* no suele ser productiva.

Las dianas utilizadas son variadas, como el gen de la citadhesina P1, 16S rRNA, espaciador 16S-23S rRNA, gen de la toxina CARDS o el operon de la ATPasa, entre otras.

Existe gran número de técnicas disponibles, convencionales o a tiempo real, pero las técnicas caseras están quedando cada vez más relegadas a expensas de la amplia disponibilidad de reactivos comerciales, que en muchos casos pueden ser técnicas de PCR múltiple en paneles sindrómicos, que permiten el diagnóstico de neumonía por *M. pneumoniae* a la vez que de otros patógenos causantes de un cuadro clínico similar (por ejemplo, *C. pneumoniae* o *L. pneumophila*).

Tabla 9: Test comerciales disponibles para la detección molecular de *M. pneumoniae*.

Adaptada de: Waites KB, Xiao L, Liu Y, Balish MF, Atkinson TP. *Mycoplasma pneumoniae* from the Respiratory Tract and Beyond. *Clinical microbiology reviews*. 2017;30(3):747-809.

Reactivo	Técnica/método de detección	Patógenos detectados	Fabricante
Loopamp <i>Mycoplasma pneumoniae</i> DNA amplification kit	LAMP, turbidimetría	<i>M. pneumoniae</i>	Eiken Chemical, Tokyo, Japón
Illumigene <i>Mycoplasma</i>			Meridian BioScience, Inc., Cincinnati, OH, USA
FilmArray RP	PCR múltiple, microarray	<i>B. pertussis</i> <i>M. pneumoniae</i> <i>C. pneumoniae</i> diversos virus respiratorios	bioMérieux/Biofire Diagnostics, Inc., Salt Lake City, UT, USA
Chlamylege	PCR múltiple, hibridación	<i>M. pneumoniae</i> <i>C. pneumoniae</i> <i>Legionella</i> spp.	Argene, Inc. Shirley, NY, USA
ArgeneChla/Myco pneumo assay	PCR múltiple a tiempo real	<i>M. pneumoniae</i> <i>C. pneumoniae</i>	bioMérieux/Argene Marcy l'Etoile, Francia
<i>Mycoplasma/Chlamydomphila pneumoniae</i> real-time PCR kit	PCR dúplex a tiempo real		Diagenode, Liege, Bélgica
Simplex <i>M. pneumoniae</i>	PCR monoplex a tiempo real	<i>M. pneumoniae</i>	Focus Diagnostics, Cypress, CA, USA
<i>Mycoplasma pn. Q-PCR Alert</i>			Nanogen Advanced Diagnostics, Buttigliera Alta, Italia
Venor MP			Minerva BioLabs, Berlín, Alemania
Genaco Resplex I	PCR múltiple a tiempo real	<i>M. pneumoniae</i> <i>C. pneumoniae</i> <i>L. pneumophila</i> <i>H. influenzae</i>	Qiagen, Venlo, Países Bajos

		<i>N. meningitidis</i>	
RespiFinder 19	PCR múltiple, electroforesis capilar	<i>M. pneumoniae</i> <i>C. pneumoniae</i> <i>L. pneumophila</i> <i>B. pertussis</i> several viruses	Patho Finder, Maastricht, Países Bajos
RespiFinder SMART 22	PCR múltiple a tiempo real	<i>M. pneumoniae</i> <i>C. pneumoniae</i> <i>L. pneumophila</i> <i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i> <i>S. pneumoniae</i> <i>H. influenzae</i>	Seegene Inc., Seoul, Korea
Allplex™ PneumoBacter Assay			
Seeplex® PneumoBacter ACE detection		<i>M. pneumoniae</i> <i>C. pneumoniae</i> <i>L. pneumophila</i> <i>B. pertussis</i> , <i>S. pneumoniae</i> <i>H. influenzae</i>	
Anyplex™ II RB5 Detection		<i>M. pneumoniae</i> <i>C. pneumoniae</i> <i>L. pneumophila</i> <i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i>	
GeneProof <i>M. pneumoniae</i>	PCR monoplex a tiempo real	<i>M. pneumoniae</i>	GeneProof, Brno, República Checa
BactoReal <i>Mycoplasma pneumoniae</i>			Ingenetix GmbH, Vienna, Austria
<i>M. pneumoniae</i> LightMix kit			TIB MolBiol, GmbH, Berlín, Alemania
BD Probe Tec ET	Desplazamiento de hebra, fluorescencia		BD Diagnostics, Sparks, MD, USA
NucliSENS Easy Q	Multiplex NASBA	<i>M. pneumoniae</i> <i>C. pneumoniae</i>	bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia

Además de las técnicas clásicas de PCR, podemos encontrar diversas tecnologías adicionales, como son la LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*), que utiliza una temperatura constante para la amplificación del DNA, la cual es detectada por un aumento de turbidez por depósitos de pirofosfato de magnesio. Al no existir variación de temperatura, es un método más sencillo y barato, adecuado para aquellos laboratorios que no poseen instalaciones adecuadas o personal formado en la realización de PCR. Otro de los métodos disponibles es el NASBA (*Nucleic Acid Sequence Based Amplification*), basado en la detección de RNA por un proceso complejo que incluye la síntesis de DNA a través de una transcriptasa reversa en condiciones isotérmicas.

Independientemente de la metodología utilizada, controlar la calidad de los procesos es esencial para evitar la aparición de resultados falsos positivos (contaminación cruzada, sobre todo en PCR convencional) o falsos negativos (sustancias inhibidoras de PCR, preparación incorrecta de reactivos o condiciones de PCR o de extracción del material genético inadecuadas).

Considerando todos estos factores, y teniendo en cuenta que *M. pneumoniae* puede persistir colonizando nasofaringe durante periodos variables de tiempo sin ocasionar ningún tipo de patología, el diagnóstico de *M. pneumoniae* con técnicas moleculares no debe realizarse de forma aislada, sino en conjunto con otras técnicas como la serología, y teniendo en cuenta el tipo de paciente y la clínica que presenta.

Por ejemplo, en el caso de tener un resultado de PCR positiva con una serología negativa, existen múltiples explicaciones plausibles: que se trate de un paciente de edad avanzada o niños muy pequeños con baja respuesta inmune o que la muestra de suero se haya tomado muy al inicio de la infección, correspondiendo con el periodo ventana para la síntesis de anticuerpos.

También podría ocurrir el caso contrario: una PCR con resultado negativo y una serología positiva, lo que podría ocurrir tras tratamiento antibiótico, ya que los anticuerpos permanecen elevados durante periodos prolongados tras la infección (44, 110, 111).

Por otro lado, no existe un punto de corte concreto en copias/mL que nos permita distinguir con técnicas moleculares si un paciente tiene una infección activa o está colonizado, por lo que la combinación de métodos diagnósticos parece la opción más acertada para no sobreestimar los diagnósticos por *M. pneumoniae*.

Mycoplasma genitalium

En el caso de *M. genitalium*, las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos suponen la herramienta principal de diagnóstico. Su principal diana es la adhesina MgPa. A pesar de estar comercializados numerosos reactivos para la detección por PCR en tiempo real, muchos de ellos no están aprobados por la FDA (112) y los que poseen marcado CE se basan en una validación limitada.

La mayoría de los kits de PCR son en tiempo real, y pueden contener *M. genitalium* como diana única (aunque normalmente no solo proporcionan la detección del microorganismo, sino que detectan las principales mutaciones asociadas a resistencia antibiótica) o de tipo multiplex, que permiten el diagnóstico sindrómico de las infecciones de transmisión sexual con la detección simultánea de los principales patógenos asociados. En este último caso, en caso de detectar *M. genitalium*, habría que realizar posteriormente el análisis molecular de resistencia antibiótica.

A diferencia con *M. pneumoniae*, en el caso de *M. genitalium* no existen como tal los portadores asintomáticos, sino que todos los pacientes son infectados, sintomáticos o asintomáticos, pero el manejo de cada grupo es totalmente distinto. Dado el potencial de este microorganismo de convertirse en una de las próximas superbacterias multirresistentes a la mayoría de las opciones terapéuticas, la guía europea de 2021 recomienda su búsqueda únicamente en pacientes sintomáticos, y en los casos en que sea detectado, realizar el tratamiento correspondiente (92).

Esto es relevante, porque el uso de paneles tipo multiplex para el diagnóstico sindrómico se emplea en ocasiones para cribados poblacionales en búsqueda de *C. trachomatis*. En este tipo de poblaciones, en caso de detectar *M. genitalium*, solo debe ser tratado si se constata la presencia de sintomatología con el objetivo de minimizar la generación de resistencias.

Respecto al tipo de muestra en el que se debe realizar el diagnóstico molecular, es complicado decantarse debido a que la rentabilidad de la muestra analizada está directamente relacionada con el tipo de método de extracción y PCR empleada posteriormente.

Según la actual Guía Europea para el manejo de las infecciones causadas por *M. genitalium* (92), la orina de primera micción es la muestra recomendada en hombres, mientras que los exudados vaginales (recogidos por un profesional sanitario o mediante auto-toma) también presentan una sensibilidad adecuada (incluso superior a la de orina o exudado endocervical), por lo que son la localización de elección en caso de tener una única muestra de la paciente (79). Los exudados rectales también son una muestra óptima especialmente en el caso de HSH, en los que hasta un 70% de las infecciones en esta localización no serían detectadas si no se recoge este tipo de muestra (ya que habitualmente presenta poca sintomatología). Sin embargo, dado el elevado riesgo de resistencia combinada a macrólidos y quinolonas en este colectivo, en la actualidad solo se recomienda la búsqueda de *M. genitalium* en pacientes con proctitis sintomática en los que se hayan descartado los patógenos más habituales (*C. trachomatis* y *N.gonorrhoeae*) (92). Otras muestras, como el fluido epididimal, la biopsia prostática o muestras tubáricas pueden ser empleadas en casos concretos, pero no de forma rutinaria.

Nuevos métodos diagnósticos

Entre las nuevas tecnologías disponibles para el diagnóstico se encuentra el espectrómetro de masas tipo MALDI-ToF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization- time of flight*). Este método se utiliza de manera rutinaria en muchos laboratorios clínicos para la identificación

de microorganismos a partir de cultivo, y este punto es el limitante en el caso de los micoplasmas. Como hemos mencionado anteriormente, el cultivo solo se realiza en centros de referencia, pero en este tipo de instalaciones, diversos estudios señalan que la concordancia de identificación entre MALDI-TOF y métodos convencionales en el caso de *M. pneumoniae* es muy elevada y que su empleo para el subtipado de cepas en función de la proteína P1 presenta una sensibilidad y especificidad excelente (113, 114).

Otras tecnologías con amplio potencial son el NA-SERS (*nanorod array-surface enhanced Raman spectroscopy*), que en los estudios realizados ha mostrado capacidad para la identificación y tipado de *M. pneumoniae* de forma simultánea, lo que la convierte en una posible herramienta de nueva generación para su futura aplicación a nivel diagnóstico, y la Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).

Esta última se trata de una técnica fenotípica introducida en los años 50, que permite la diferenciación de los microorganismos basándose en la comparación de los patrones de absorción de la luz infrarroja tras la aplicación de la transformada de Fourier (115). Estos patrones varían en función de los grupos funcionales presentes en las biomoléculas, como son las proteínas, lípidos o carbohidratos, contribuyendo estos últimos de forma más significativa a las diferencias entre los espectros de bacterias de la misma especie.

El FTIR se ha aplicado ampliamente en investigación biomédica, especialmente en el campo del cáncer por su capacidad de detectar alteración celular, y más recientemente a nivel microbiológico para la caracterización de brotes causados por cepas multirresistentes (116).

Respecto a los micoplasmas, esta técnica se ha empleado como método de detección de contaminaciones de cultivos celulares por distintas especies de *Mycoplasma*, pero aún no se han descrito estudios aplicados al diagnóstico clínico (117, 118).

1.5. Estudios epidemiológicos: técnicas de tipado molecular de cepas

Mycoplasma pneumoniae y *Mycoplasma genitalium* poseen genomas de pequeño tamaño, y a pesar de su similitud genética, los estudios epidemiológicos sobre *M. pneumoniae* son numerosos, frente a la escasa información disponible para *M. genitalium*. Ambos poseen regiones con un elevado número de repeticiones, distribuidas en regiones similares pero no de forma idéntica: en *M. pneumoniae* suponen hasta un 8% del total del genoma

(RepMP 1, 2/3, 4 y 5), y en *M. genitalium* un 4% (nueve zonas, conociéndose como regiones MgPar).

Existen diferentes métodos de tipado, aplicados bien a la caracterización de las principales proteínas de adhesión de cada especie, o bien a las regiones con alto número de repeticiones, como el MLVA (*multi-locus variable-number tandem-repeats analysis*), el MLST (*multilocus secuencia typing*) o las técnicas de genotipado SNP (*single nucleotide polymorphisms*). El índice de discriminación (ID) de una técnica de tipado debe ser igual o superior a 0.9 para considerarla como adecuada para la correcta diferenciación entre cepas.

Todas estas técnicas parece que serán desplazadas por la secuenciación masiva, con mayor poder de discriminación, que podría utilizarse tanto en rutina clínica como en el estudio de brotes y diseminación de cepas resistentes.

Además de las anteriores, otras técnicas han sido desarrolladas, pero no empleadas de forma general, como la PCR con análisis de curvas de melting o la pirosecuenciación para diferenciar los diferentes genotipos de p1 en *M. pneumoniae*. Asimismo, el MALDI-ToF se ha mostrado útil tanto para la identificación de esta bacteria como para la diferenciación de los dos principales subtipos, y el NA-SERS o el FTIR, descritas en el apartado de diagnóstico, también están en pleno desarrollo para su empleo en la caracterización de las cepas (119).

Describamos a continuación las principales técnicas de caracterización molecular:

1. Tipado de genes codificantes de proteínas de adhesión:

En ambos micoplasmas, la secuenciación de los genes codificantes de proteínas de adhesión ha sido el método más utilizado para la caracterización molecular.

En el caso de *M. pneumoniae*, la secuenciación del genoma de la proteína P1 para la clasificación en los subtipos 1 y 2 ha sido llevada a cabo por diversas tecnologías que han ido evolucionando con los años. El primer método molecular para el tipado de cepas de *M. pneumoniae* fue la técnica de huella de DNA (*DNA fingerprinting*) mediado por PCR, el cual confirmó la presencia de dos tipos principales de cepas (119). Posteriormente aparecieron otros métodos más dirigidos que permitían una mayor diferenciación, como los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) o la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), que requerían partir de un cultivo de microorganismo para conseguir grandes cantidades de DNA.

Dada la complejidad para cultivar esta bacteria, posteriormente se comenzaron a utilizar las técnicas de tipado partiendo de una PCR previa en vez de cepa, lo que permitía obtener la cantidad de ácidos nucleicos necesaria sin necesidad de cultivo. A partir de este producto amplificado, se han utilizado tanto las propias técnicas de RFLP mencionadas previamente y otras metodologías, como la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) o el análisis en la variación de temperaturas de fusión (*high resolution melting* – HRM), que permite visualizar las mutaciones por diferencias de temperatura de fusión entre la cepa salvaje (*wild-type*) y las cepas mutadas.

La secuenciación masiva, con alto poder discriminatorio, ha permitido analizar en profundidad el genoma del microorganismo, detectando múltiples variaciones entre los subtipos 1 y 2 no solo a nivel de los elementos repetitivos. Aun así, parece que ambos subtipos corresponden a linajes estables a lo largo del tiempo, y lo interesante de este tema radica en ver las diferencias a nivel clínico que implica la detección de uno u otro subtipo. Por ejemplo, se ha constatado que ambos subtipos producen distintos tipos de biofilm, o que el subtipo 2 podría tener una mayor expresión de toxina CARDS. Las líneas de investigación actuales se centran en encontrar si existe relación entre los subtipos de P1 y la gravedad clínica de los cuadros o la resistencia antibiótica, pero actualmente se requieren más estudios para demostrar las premisas anteriores.

2. En el caso de *M. genitalium*, el tipado del gen *mgpB* que codifica para la principal adhesina de la bacteria (MgPa o P140) es la principal herramienta de caracterización genómica, al haber demostrado poseer un poder discriminatorio adecuado, además de ser reproducible y estable. A diferencia de *M. pneumoniae*, la caracterización de esta región ha generado cerca de 250 subtipos descritos en la actualidad, confirmando la variabilidad de esta región por sus polimorfismos. El ID empleando el gen *mgpB* oscila entre 0.82 y 0.99. **Genotipado de polimorfismos de nucleótido único (SNPs):** la diferenciación de subtipos no está restringida a los genes de las adhesinas de ambas especies, sino que existen otros loci o SNPs tributarios de ser analizados, como son el 16S rRNA, el 23S rRNA, la región espaciadora entre ambos o el operon rRNA (120)

En el caso de *M. pneumoniae*, con estas dianas, técnicas como el NASBA, las PCRs en tiempo real y la pirosecuenciación (técnica que trataremos en detalle más adelante) han permitido la correcta clasificación de los subtipos.

Tal como referíamos en el apartado previo, los estudios realizados en *M. genitalium* están basados en la búsqueda de este tipo de polimorfismos. En 2006, la caracterización molecular de las cepas por SNPs del gen *mgpB* sirvió para demostrar la transmisión sexual de este patógeno (121). Los estudios actuales buscan evaluar la dinámica de transmisión de este patógeno, así como la relación de los genotipos con las mutaciones asociadas a resistencia antibiótica (122, 123).

3. **Multilocus Variable-number tandem-repeat Analysis (MLVA):** este método fue desarrollado por Dégrange et al. en 2009 (124) para el tipado de *M. pneumoniae*. Se basaba en el análisis de 5 regiones de repeticiones en tándem (*variable-number tandem-repeat* – VNTR) que clasificó como loci Mpn1 y Mpn13-16, polimórficas, pero con alta estabilidad. Esto hizo que se convirtiese en un método adicional de clasificación para *M. pneumoniae*, ya que proporcionaba más información que el subtipado de la proteína P1 y poseía un ID de 0.92. El inconveniente que presenta es que, de las 5 regiones, el locus Mpn1 es inestable, por lo que muchos autores propusieron la creación de un esquema de MLVA que incluyese los otros cuatro locus (Mpn13-Mpn16). Esto redujo el poder discriminatorio de la técnica al disminuir el número de patrones de MLVA, pero mejoró significativamente la robustez de la técnica. Este nuevo esquema de tipado reveló que los patrones más comunes en los últimos 10 años en diversas partes del mundo fueron el 4-5-7-2, 3-5-6-2 y 3-6-6-2. Algunos estudios encuentran una relación estadísticamente significativa entre el patrón 4-5-7-2 y una mayor tasa de resistencia a macrólidos (125). Dado que en la actualidad se dispone de técnicas de secuenciación masiva, uno de los objetivos es la búsqueda de nuevos locus para ampliar el esquema de MLVA y aumentar su poder discriminatorio. La aplicación del MLVA con 4 ó 5 loci puede depender del objetivo deseado: para estudios epidemiológicos a largo plazo o globales, el esquema estable de 4 regiones es el adecuado, mientras que para estudios epidemiológicos a corto plazo, el esquema completo aporta una información más precisa (126).

En *M. genitalium* se ha empleado el estudio de regiones cortas repetitivas en el gen MG309, el cual codifica para una lipoproteína de superficie y que posee un índice de discriminación entre 0.84 y 0.95 (119). El MLVA también ha sido empleado, pero los resultados obtenidos revelaron que la inestabilidad *in vivo* de las regiones repetitivas en este microorganismo hace que, a pesar de su elevado poder discriminatorio, no sea una técnica adecuada para la realización de estudios de transmisión en este patógeno. El análisis de SNPs en *mgpB* es el recomendado

para estudios epidemiológicos, y la combinación de esta técnica con el estudio de las repeticiones cortas (*short tandem repeat*) del gen MG309 podría ser utilizado en estudios que se focalicen en redes de transmisión sexual concretos por su elevado poder de discriminación ($ID \geq 0.95$) (127).

4. **Multilocus Sequence Typing (MLST):** esta técnica de tipado se ha empleado únicamente en *M. pneumoniae* y se desarrollaron dos métodos basados en el análisis de polimorfismos de 8 genes (MPN003, MPN185, MPN246, MPN307, MPN528, MPN576, MPN600 y MPN628) que codifican para proteínas constitutivas (128) o para proteínas constitutivas (MPN004, MPN050, MPN168, MPN246 y MPN516), lipoproteínas (MPN442 y MPN582) y la adhesina P1 (MPN141) (129). Ambos métodos pueden ser utilizados tanto en la caracterización de cepas obtenidas por cultivo como a partir del extraído de DNA de muestras positivas (130), proporcionando un código numérico o un perfil de mutaciones puntuales comparable entre diferentes laboratorios. Además, el estudio de Brown et al. diseñó una base de datos que incluía todos los genotipos detectados por MLST y la comparación entre los diversos perfiles obtenidos (128).

Estas técnicas aportan un mayor poder discriminativo que el esquema de MLVA de 4 locus o el tipado de la proteína P1. No requieren cultivo, pero la parte de secuenciación tiene precio elevado y es muy laboriosa.

Para evitar los inconvenientes de secuenciación de la técnica anterior, surgió la tecnología *SnaPshot*, que también analiza 8 genes y que detecta SNPs por una emisión de fluorescencia. Su tiempo de realización es de solamente unas 7 horas a partir de DNA extraído, por lo que se puede emplear en muestras clínicas sin necesidad de cultivo. Su poder discriminativo es también superior al esquema de MLVA en 4 regiones (44).

1.6. Tratamiento de las infecciones causadas por *M. pneumoniae* y *M. genitalium*

Los micoplasmas son bacterias que carecen de pared celular, lo que hace que sean intrínsecamente resistentes a aquellos antibióticos que interfieren en su proceso de síntesis, como son los antibióticos betalactámicos, los glucopéptidos o la fosfomicina. Además, otros antimicrobianos como son el trimetoprim, sulfonamidas, rifampicina,

polimixinas, ácido nalidíxico y algunas oxazolidinonas, como el linezolid, también son inactivas, por lo que restan pocas opciones para el tratamiento de estos microorganismos.

Los antimicrobianos que clásicamente se han empleado en su tratamiento son aquellos que actúan inhibiendo la síntesis de proteínas a nivel del ribosoma bacteriano, como son macrólidos, ketólidos, estreptograminas y tetraciclinas, o aquellos que inhiben la replicación del DNA interfiriendo con las topoisomerasas, como son las quinolonas.

A continuación, se exponen los diferentes matices existentes en cada especie en relación con el tratamiento de las infecciones que producen.

Mycoplasma pneumoniae

En los años 60, cuando se describieron las primeras infecciones causadas por *M. pneumoniae*, existía cierta tendencia a asumir que el tratamiento antibiótico no era necesario por tratarse de una enfermedad autolimitada que se resolvía sin necesidad de antimicrobiano. Con el paso de los años, se ha comprobado que la administración de antibióticos reduce tanto la duración de los síntomas respiratorios como la transmisión de la bacteria.

A nivel general, macrólidos y ketólidos son los antimicrobianos más potentes frente a *M. pneumoniae*, con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) ≤ 0.001 $\mu\text{g/ml}$. Claritromicina y azitromicina han sido utilizadas ampliamente, dado que ambas mejoran la tolerabilidad que tenía eritromicina y, además, la azitromicina tiene mayor semivida plasmática, permitiendo cursos de 5 días de tratamiento.

En cuanto a las tetraciclinas, tanto doxiciclina como tetraciclina son activas (siendo doxiciclina más potente con CMI ≤ 0.25 $\mu\text{g/ml}$) y deben considerarse en los casos con afectación a nivel del sistema nervioso central. El uso de estos antimicrobianos irá ligado al uso de corticosteroides, y en los casos de encefalomiелitis aguda diseminada, la plasmaféresis o las inmunoglobulinas intravenosas deben ser consideradas si los corticoides no surten efecto.

Las fluoroquinolonas presentan CMI algo superiores a los macrólidos (0.06-0.125 $\mu\text{g/ml}$, dentro del rango de sensibilidad), y dada su actividad bactericida, su uso está indicado en la erradicación de infecciones en pacientes inmunodeprimidos o en infecciones extrarrespiratorias.

Durante muchos años, los macrólidos han sido el tratamiento de elección en las infecciones causadas por *M. pneumoniae*, sobre todo en niños en los que las quinolonas y las tetraciclinas están contraindicadas por su potencial toxicidad.

A pesar de todo, la situación más habitual en los servicios médicos (ya sea en atención primaria u hospitalaria), es la de atender a un paciente con clínica de NAC cuya etiología es desconocida en ese momento, y que requiere de un tratamiento empírico. En adultos con buen estado general, lo habitual es prescribir un tratamiento que cubra los principales agentes causales del cuadro clínico (*S. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* y *L. pneumophila*), como es la combinación de un betalactámico con un macrólido (amoxicilina o amoxicilina/ác. clavulánico más azitromicina o claritromicina) o una fluoroquinolona en monoterapia levofloxacino o moxifloxacino). En pacientes que requieran ingreso, se puede optar por una fluoroquinolona en monoterapia, o, lo más habitual, la combinación de un antibiótico betalactámico (ceftriaxona o cefotaxima) con una fluoroquinolona o amoxicilina/ác. clavulánico con un macrólido (131). Esta información, así como otras posibles situaciones (ingresos en unidades de cuidados intensivos, broncoaspiración...) quedan detallados en la **Tabla 10**:

Tabla 10: Tratamiento de la NAC en adultos. Extraída de: R. Menéndez et al. Arch Bronconeumol. 2010;46(10):543–558

Tratamiento ambulatorio	Moxifloxacino o levofloxacino: 5 a 7 días Amoxicilina o amoxicilina/clavulánico o cefditoren (todos ellos 7 días)+macrólidos (azitromicina 3–5 días o claritromicina 7 días) Todos por vía oral
Tratamiento cuando se precisa ingreso en una sala de hospitalización	Cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima o ceftriaxona) o amoxicilina-clavulánico más un macrólido (azitromicina o claritromicina) Levofloxacino en monoterapia En todos los casos inicio del tratamiento por vía intravenosa El levofloxacino puede iniciarse por vía oral Duración del tratamiento 7–10 días
Tratamiento cuando se precisa ingreso en la UCI	Cefalosporina no antipseudomónica a dosis altas (ceftriaxona 2 g/24 h, cefotaxima 2 g/6–8 h) por vía intravenosa+macrólido (azitromicina 500 mg/día o claritromicina 500 mg/12 h) por vía intravenosa Alternativa: levofloxacino por vía intravenosa (500 mg/12 h) en vez de macrólidos Duración del tratamiento 7–14 días
Sospecha de aspiración	Amoxicilina-clavulánico por vía intravenosa (amoxicilina 2 g/8 h) 14 días o moxifloxacino, ertapenem o bien clindamicina
Sospecha de infección por <i>P. aeruginosa</i>	Piperacilina-tazobactam o cefepima o carbapenem (imipenem o meropenem) por vía intravenosa+ciprofloxacino por vía intravenosa (400 mg/8 h) o levofloxacino (500 mg/12 h) o bien+aminoglucósido en lugar de la quinolona: tobramicina por vía intravenosa (6 mg/kg/24 h) o amikacina por vía intravenosa (15 mg/kg/24 h) Duración del tratamiento 14 días

En niños, el tratamiento empírico de elección en las formas típicas leves es la amoxicilina oral, a dosis de 80mg/kg/día, y en las graves se recomienda la combinación de cefalosporina de tercera generación y cloxacilina (o clindamicina o vancomicina) por vía intravenosa. En las formas atípicas, se optará por un macrólido en mayores de 5 años (132).

Tabla 11: Tratamiento de la NAC en niños. Extraída de: A. Andrés-Martín et al. Arch Bronconeumol. 2020;56(11):725–741

Tratamiento ambulatorio	
Neumonía típica	Amoxicilina por vía oral 80 mg/kg/día repartido en 3 dosis (cada 8 h). Máximo 6.000 mg/día, 7 días
Neumonía atípica por <i>Mycoplasma</i> o <i>Chlamydia</i>	Azitromicina por vía oral 10 mg/kg/ cada 24 h (máximo 500 mg/día, 3 días)
Tratamiento paciente hospitalizado	
Neumonía típica sin derrame pleural paraneumónico	Claritromicina por vía oral 15 mg/kg/ día, cada 12 h, máximo 1.000 mg/día, 7 días
Neumonía típica con derrame pleural paraneumónico	Opciones igualmente válidas: Ampicilina IV: 150-200 mg/kg/día, cada 6 h (máximo 12 g/día) Penicilina G sódica IV: 250.000-300.000 UI/kg/día, cada 4 h (máximo 24 millones UI/día)
NAC típica en paciente grave (UCIP)	Opciones igualmente válidas: Ampicilina IV: 250-300 mg/kg/día, cada 6 h (máximo 12 g/día) Penicilina G sódica IV: 300.000-400.000 UI/kg/día, cada 4 h (máximo 24 millones UI/día) Cefotaxima (200-300 mg/kg/día, cada 6 h; máx. 12 g/día) + uno de los siguientes ^a : cloxacilina IV (150-200 mg/kg/día, cada 6 h; máx. 6 g/día) o clindamicina IV (30-40 mg/kg/día, cada 6-8 h; máx. 4,8 g/día ^b) o vancomicina IV (60 mg/kg/día, cada 6 h; máx. 4 g/día ^c) ± macrólido IV (opciones: azitromicina 10 mg/kg/día, cada 24 h; claritromicina 15 mg/kg/día, cada 12 h) Cefotaxima (200 mg/kg/día) + macrólido IV (claritromicina o azitromicina) ± cotrimoxazol IV (20 mg de trimetoprim/kg/día, cada 6 h ^d)
NAC con patrón intersticial en paciente grave (UCIP)	

IV: vía intravenosa; NAC: neumonía adquirida en la comunidad; SARM: Staphylococcus aureus resistente a meticilina; UCIP: Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos.

^a Este grupo no ha llegado a un consenso unánime respecto a la recomendación de añadir un antiestafilocócico de forma habitual en estos casos. Linezolid, se sitúa en un último escalón.

^b en caso de neumonía necrosante o shock tóxico

^c si >10% de SARM en la comunidad, infección de piel y partes blandas u osteoarticular

^d en caso de NAC intersticial grave con sospecha de inmunodepresión

En caso de una alta sospecha clínica o que el diagnóstico microbiológico confirme la presencia de *M. pneumoniae*, el tratamiento de elección en nuestro país sería un macrólido.

Fue a partir de los años 2000, cuando se describieron por primera vez cepas resistentes a macrólidos en Japón por el uso extendido de este tipo de antimicrobianos, con su consecuente problemática. Desde su aparición, se extendieron en gran proporción por toda Asia (donde, en la actualidad, entre el 90 y el 100% de las cepas son resistentes a macrólidos), y en menor medida por Norteamérica y Europa. En nuestro continente, las tasas de resistencia oscilan desde niveles muy bajos, desde un 0.2% en Suecia (133), un 1% en Eslovenia (134), 8-9% en Francia e Inglaterra (135, 136), un 19% en Escocia (137), un 25.6% en Italia (138).

Ante esta situación, el uso de macrólidos constituye un tema de debate. Por un lado, no se ha demostrado una mayor virulencia de las cepas resistentes y muchos pacientes evolucionan favorablemente con macrólidos a pesar de estar infectados por una de estas cepas. Pero, por otro, la duración de la fiebre, la estancia hospitalaria y los síntomas respiratorios es superior, así como el incremento de complicaciones extrarrespiratorias (139).

En España, dada la baja prevalencia de cepas resistentes, la azitromicina continúa siendo la primera línea de tratamiento (132). Como la detección de patrones de resistencia en general no suele hacerse de forma rutinaria, el marcador de buena evolución con el macrólido es la desaparición de la fiebre en 48-72h. En los casos en que se acredite la

presencia de una cepa resistente a macrólidos, la doxiciclina o las fluoroquinolonas serían la alternativa de tratamiento, teniendo en cuenta que en niños muchas veces la infección se resuelve de forma espontánea y que, en general, no se recomienda el uso de estos antimicrobianos por sus potenciales efectos adversos. El uso de estas dos alternativas sí que es una opción en aquellas regiones con un elevado porcentaje de resistencia a macrólidos, como es Japón, donde las guías para el tratamiento de las infecciones respiratorias incluyen el uso de tosufloxacin o minociclina (esta última en niños mayores de 7 años) en los casos de evolución desfavorable tras el uso de azitromicina (140).

La duración de la terapia no está bien establecida, y a menudo se basa en la evolución de los síntomas, ya que el hecho de que la bacteria persista en el organismo no es indicador de mala evolución. Lo habitual es que los tratamientos sean más prolongados en pacientes con algún tipo de inmunosupresión, y que en el caso de presentarse complicaciones extrarrespiratorias se utilice algún otro fármaco adyuvante, como los corticoides o las inmunoglobulinas (141).

Entre las nuevas opciones terapéuticas encontramos la lefamulina, una pleuromutilina activa *in vitro* e indicada en aquellos casos de cepas resistentes a macrólidos en los que no exista otra alternativa válida (142).

Mycoplasma genitalium

La resistencia antibiótica en *Mycoplasma genitalium* es un problema de interés a nivel mundial. El incremento rápido en la resistencia a macrólidos, así como la aparición de resistencia en fluoroquinolonas en los últimos años, condiciona y limita las opciones terapéuticas disponibles para el tratamiento de las infecciones causadas por esta bacteria.

Machalek et al. publicaron en 2020 un metaanálisis acerca de las resistencias a macrólidos y quinolonas en *M. genitalium* a nivel mundial (143), observando una prevalencia general en la resistencia a macrólidos en torno a un 51%, lo que contrasta con las cifras disponibles hasta el año 2010, donde este valor era de un 10%. Este aumento está justificado por el empleo de azitromicina en monodosis de 1g para el tratamiento sintomático y etiológico de las ITS introducido en los años 90, y ha ocurrido en un contexto en el que no se testaba apenas la presencia de *M. genitalium* y la facilidad de esta bacteria para seleccionar o generar *de novo* mutaciones asociadas a resistencia. Las cifras son variables según la región analizada, con un 27.5% de media en Europa que aumenta hasta estar en torno al 50% en Australia, Japón o la región de las Américas (Canadá, Cuba y EEUU). En nuestro continente, la zona más estudiada son los países nórdicos, donde destaca una gran

diferencia entre los niveles de resistencia a macrólidos detectados en Suecia (13.9%) al 56% reportado en Noruega. Este hecho se debe al empleo de doxiciclina en el tratamiento de las ITS en Suecia, a diferencia de la mayor parte de países europeos, en los que la azitromicina ha sido el tratamiento más utilizado (143, 144).

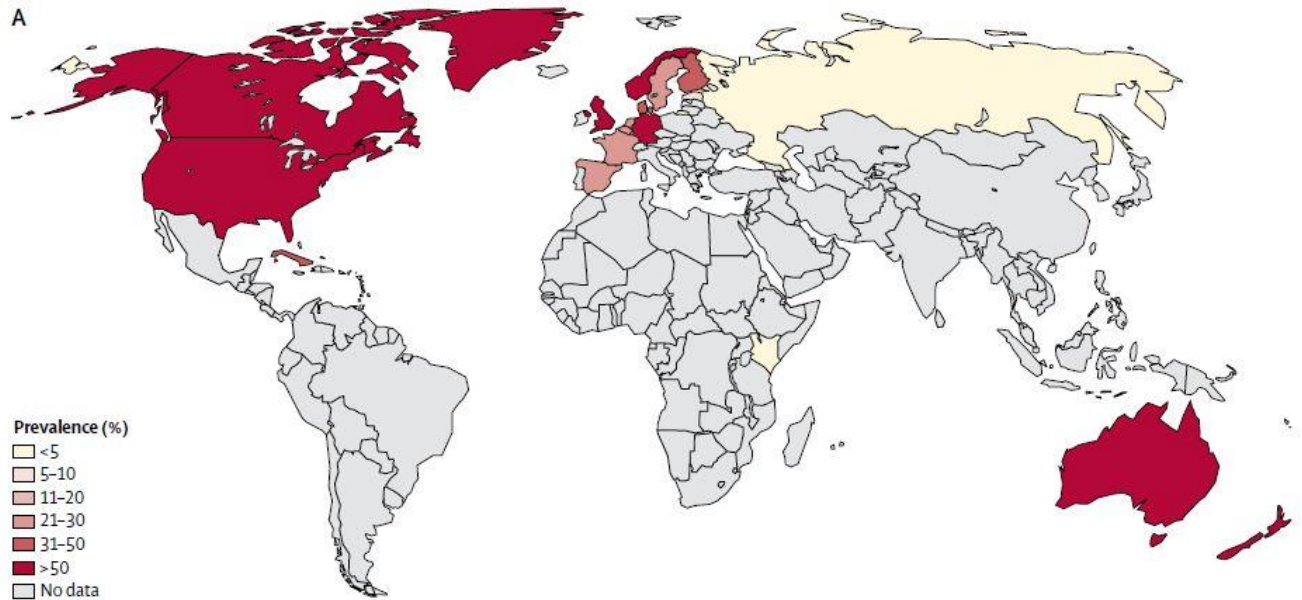


Figura 6: Mapa de prevalencia de mutaciones puntuales en el 23S rRNA asociadas a resistencia a macrólidos. Imagen extraída de: Machalek DA, Tao Y, Shilling H, Jensen JS, Unemo M, Murray G, et al. Prevalence of mutations associated with resistance to macrolides and fluoroquinolones in *Mycoplasma genitalium*: a systematic review and meta-analysis. The Lancet Infectious diseases. 2020;20(11):1302-14.

La resistencia a quinolonas no está tan extendida como la resistencia a macrólidos, pero el aumento descrito en los últimos años hace que también sea motivo de preocupación, al tratarse de la segunda línea de tratamiento. A pesar de que el porcentaje de resistencia a quinolonas parece mantenerse estable en Europa, en torno a un 8% en los últimos años, las cifras en América (10.1%) y especialmente en Asia (14.3%) son más elevadas. En Japón, por ejemplo, este porcentaje pasó de un 4.8% antes de 2010 a un 28.7% en 2016-2017.

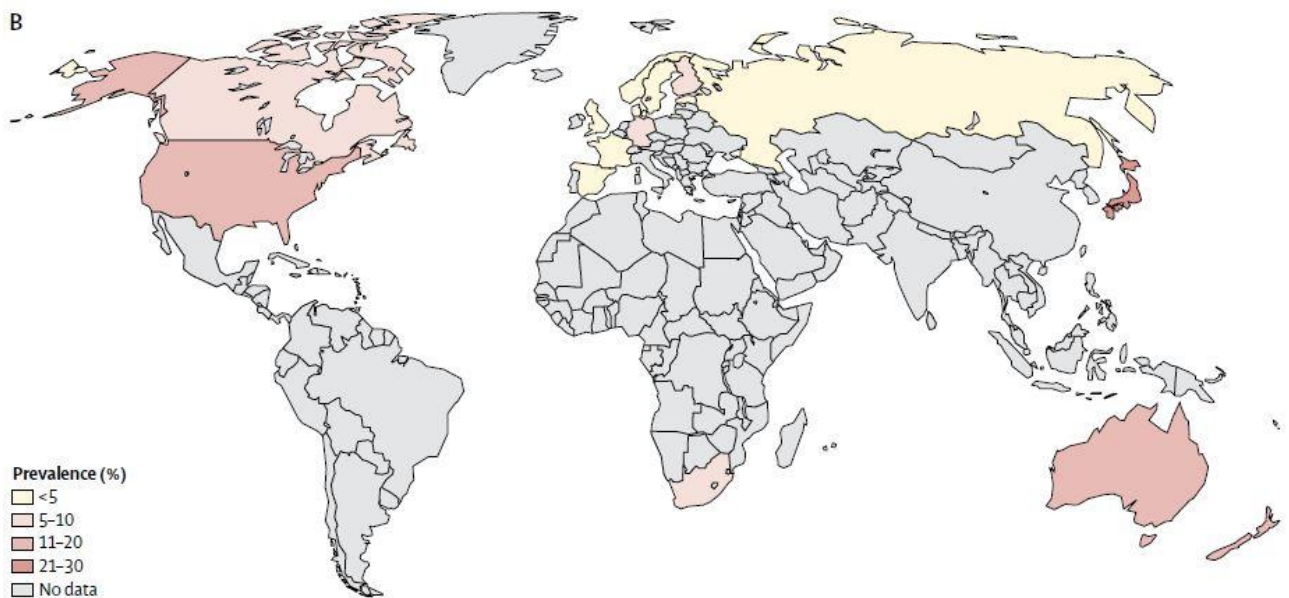


Figura 7: Mapa de prevalencia de mutaciones puntuales en el gen *parC* asociadas a resistencia a fluoroquinolonas. Imagen extraída de: Machalek DA, Tao Y, Shilling H, Jensen JS, Unemo M, Murray G, et al. Prevalence of mutations associated with resistance to macrolides and fluoroquinolones in *Mycoplasma genitalium*: a systematic review and meta-analysis. The Lancet Infectious diseases. 2020;20(11):1302-14.

Afortunadamente, el porcentaje de cepas con resistencia dual a ambas clases de antibióticos es de un 3%. La monitorización de la evolución de este tipo de resistencias junto con un uso prudente de los antibióticos es primordial, dadas las escasas opciones terapéuticas disponibles para esta bacteria (143).

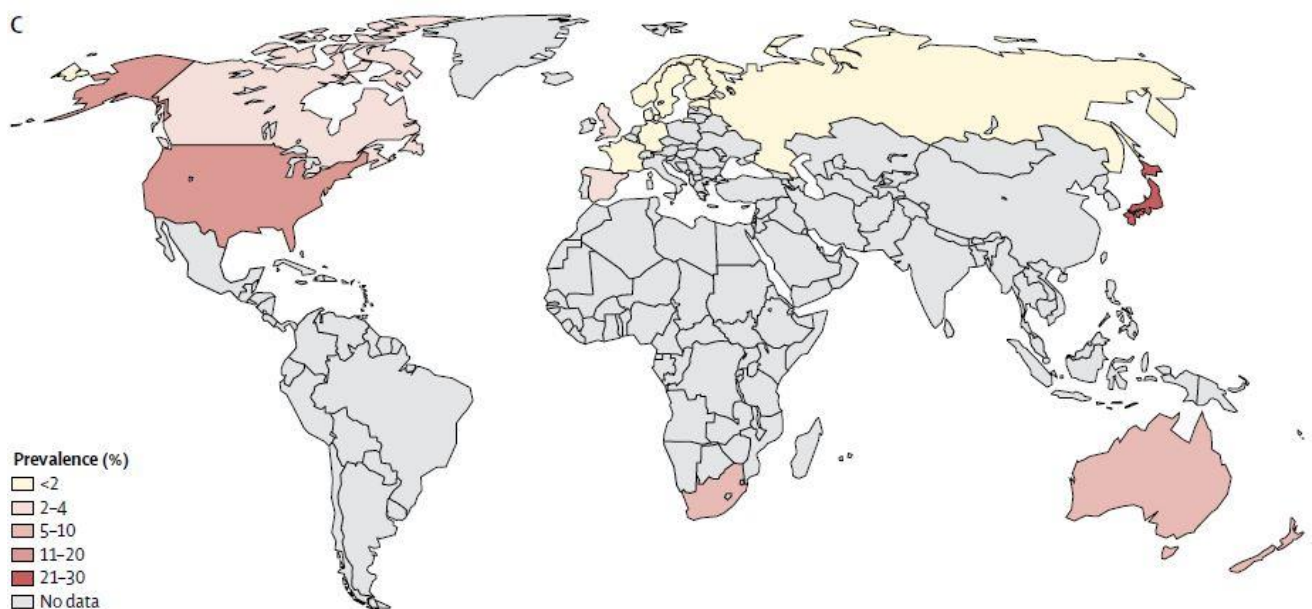


Figura 8: Mapa de prevalencia de cepas con resistencia dual a macrólidos y fluoroquinolonas. Imagen extraída de: Machalek DA, Tao Y, Shilling H, Jensen JS, Unemo M, Murray G, et al. Prevalence of mutations associated with resistance to macrolides and fluoroquinolones in *Mycoplasma genitalium*: a systematic review and meta-analysis. The Lancet Infectious diseases. 2020;20(11):1302-14.

Cabe destacar que la proporción de cepas resistentes no es homogénea en toda la población, sino que existen algunos colectivos, como son los hombres que tienen sexo con hombres y las personas con conductas sexuales de riesgo que se realizan pruebas periódicamente en clínicas de salud sexual. Ambos grupos están más expuestos a las ITS y sometidos a un mayor número de tratamientos antibióticos, situación que propicia la aparición de cepas resistentes.

El tratamiento recomendado en la actualidad en las infecciones causadas por *M. genitalium* está recogido en la guía europea publicada en 2022 por Jensen et al., “2021 European guideline on the management of *Mycoplasma genitalium* infections” (92).

Durante muchos años, los tratamientos administrados a los pacientes que acudían a una consulta con sospecha de ITS incluían combinaciones de betalactámicos con macrólidos, principalmente azitromicina 1g en monodosis, con objeto de cubrir de forma empírica agentes como *C. trachomatis* (CT). La tasa de curación de esta pauta es de un 85% en cepas sensibles a macrólidos, pero se ha demostrado que es capaz de seleccionar hasta un 10% de cepas resistentes a *M. genitalium* en los pacientes tratados (92).

El uso de esta pauta empírica en el tratamiento de las ITS o en infecciones por cepas resistentes en las que no se realiza test de curación (*test of cure* – TOC), ha desencadenado la aparición y expansión rápida de cepas de *M. genitalium* resistentes a macrólidos, candidato a convertirse en una superbacteria resistente a la mayoría de los tratamientos disponibles en un futuro próximo.

El tratamiento de las infecciones urogenitales causadas por *M. genitalium* tiene como objetivo tanto limitar su diseminación por vía sexual como prevenir las potenciales complicaciones, como la enfermedad inflamatoria pélvica o la infertilidad tubárica (92). Tal como referíamos en *M. pneumoniae*, las opciones terapéuticas se limitan a los macrólidos, fluoroquinolonas, tetraciclinas y estreptograminas.

Teniendo en cuenta lo referido anteriormente, la pauta inicial en monodosis de 1g de azitromicina se ha modificado a un régimen extendido con una dosis total de 1.5 g, en el que se administran 500mg el primer día, seguido de 250mg los días 2 a 5 de tratamiento. Este tipo de pauta sería igualmente eficaz para CT. En los casos en que se detecte una

cepa resistente o se haya administrado sin éxito la monodosis de 1g de azitromicina, el hecho de aumentar la dosis total de azitromicina a 1.5g, así como la dosificación extendida o el uso de otros macrólidos no es una opción válida.

La tasa de resistencia a macrólidos en *M. genitalium* es variable en función de la localización geográfica y en distintos grupos de pacientes (por ejemplo, es ampliamente superior en el colectivo de hombres que tienen sexo con hombres - HSH, que en otros grupos). Además, en aquellas regiones en las que la pauta de azitromicina 1g en monodosis es la utilizada para el tratamiento de uretritis no gonocócica, lo habitual es encontrar del 30-45% de cepas mutadas.

Moxifloxacino constituye la segunda línea de tratamiento, posee acción bactericida y una tasa de curación cercana al 100% en cepas susceptibles (administrando 400mg/día, durante 7 días). Sin embargo, también han aparecido cepas resistentes a las fluoroquinolonas, que causan en torno a un 30% de fallos terapéuticos (143). En numerosas ocasiones, la resistencia a quinolonas va asociada a la resistencia a macrólidos, limitando las opciones de tratamiento disponibles. Para este tipo de casos tenemos dos opciones de tercera línea: pristinamicina y doxiciclina.

En la pristinamicina se administran cuatro dosis de 1g al día, durante 10 días, consiguiendo una tasa de curación de un 75%. La doxiciclina es otra opción de tratamiento de tercera línea, con pautas de 100mg, dos veces al día, durante 14 días, pero no se han realizado estudios sistemáticos que evalúen su eficacia.

Diversos estudios han observado también que la tasa de curación con azitromicina disminuye notablemente ante la presencia de una elevada cantidad de microorganismo (145). En 2019, los australianos Read et al. establecieron el concepto de *Resistance-Guided Sequential Therapy* (RGST, terapia secuencial guiada por resistencias) para *M. genitalium*, un algoritmo que busca el éxito terapéutico en el tratamiento de las infecciones en un contexto de elevados niveles de resistencia a macrólidos (146). Este algoritmo se basa en la detección simultánea del microorganismo y las principales mutaciones asociadas a resistencia a macrólidos, para adecuar el tratamiento del paciente y conseguir la curación. Dado que, en los años previos, las principales guías terapéuticas habían recomendado el cambio de la azitromicina por doxiciclina en el manejo de la UNG, en el momento de la visita, a todos los pacientes con clínica compatible o de cervicitis o proctitis, se les administró doxiciclina (100mg, 2 veces al día, durante 7 días), con objetivo de disminuir la carga bacteriana. Una vez confirmada la presencia de *M. genitalium* y con los resultados de su perfil de resistencia a macrólidos, en el caso de que la cepa fuese

sensible, los pacientes recibían 2.5g de azitromicina (dosis de 1g día 1, seguida de 500mg en los días 2-4) y en aquellos pacientes en los que la cepa de *M. genitalium* tenía mutaciones asociadas a resistencia a macrólidos, se les administraba sitafloxacino (100mg, 2 veces al día, durante 7 días). Este esquema de doxiciclina seguido de RGST consiguió la curación de hasta el 92% de los pacientes, con mínima selección de mutantes resistentes.

Este tipo de terapia es el recomendado en la actualidad en las guías de Australia (147) y de Reino Unido (148), pero la actual guía europea únicamente recomienda este esquema en aquellos casos que requieran tratamiento inmediato y no se disponga aún de resultados microbiológicos. Las principales discrepancias de la actual guía europea con el RGST recomendado en Australia o Reino Unido se fundamentan en que no se ha demostrado que el uso de una mayor dosis de azitromicina (2.5g *versus* 1.5g) o mayor duración de la terapia con quinolonas (10 días *versus* 7 días) produzca mejores resultados, siendo además a priori contraproducente por la posibilidad de selección de resistencias en otros muchos microorganismos (92).

En resumen, el tratamiento recomendado en la actualidad para las infecciones causadas por *M. genitalium* se muestra en la **Figura 9**.

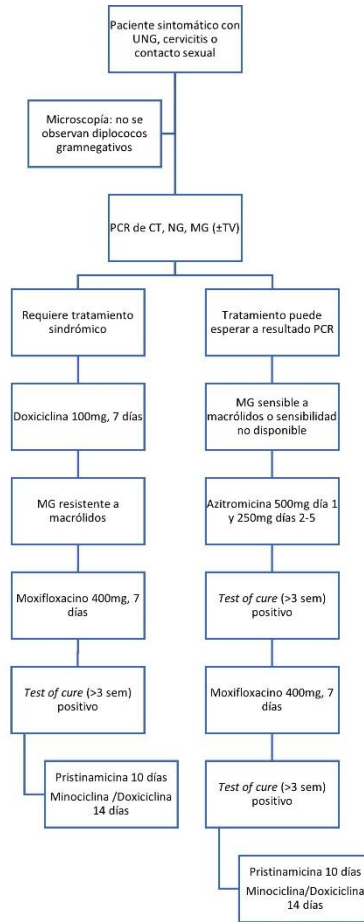


Figura 9: Resumen del diagnóstico y tratamiento de las infecciones causadas por *M. genitalium*. NG: *Neisseria gonorrhoeae*; CT, *Chlamydia trachomatis*; MG, *Mycoplasma genitalium*; TV, *Trichomonas vaginalis*.

Adaptada de: Jensen JS, Cusini M, Gomberg M, Moi H, Wilson J, Unemo M. 2021 European guideline on the management of *Mycoplasma genitalium* infections. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV. 2022.

1.6.1. Susceptibilidad antibiótica y técnicas para la detección de resistencias

Los *Mollicutes* son bacterias con alta capacidad de adaptación y supervivencia bajo condiciones extremas o de estrés, que adquieren resistencias antibióticas de forma fácil y rápida.

Su pequeño tamaño, su evolución rápida por reducción genómica y su limitada capacidad biosintética dificultan el descubrimiento de mecanismos de resistencia. Además, su elevada tasa de mutación, su resistencia natural a determinadas clases de antibióticos y su dificultad de crecimiento (que provoca que muchos cultivos se contaminen durante su

prolongada incubación a pesar de su realización en centros de referencia especializados), contribuyen a este hecho (149).

En general, los mecanismos de resistencia antibiótica bacteriana se basan en la modificación de la diana del antibiótico, la neutralización del antimicrobiano o la expulsión de este para evitar su acumulación en el interior celular. Estas resistencias pueden ser propias (intrínsecas), adquiridas del exterior o adaptativas, que se expresan en función de la situación:

- Resistencia intrínseca: supone la resistencia natural de una bacteria frente a un antimicrobiano, con objetivo de prevenir sus efectos tóxicos en la célula. Este grupo incluye las bombas de expulsión, la degradación o modificación del antibiótico (o de su diana) o la ausencia de esta. Los genes que codifican este tipo de resistencias están habitualmente localizados a nivel cromosómico. Este tipo de resistencias están presentes en los *Mollicutes* a diversos niveles (149):
 - Carencia de pared celular: resistencia a antibióticos que actúan en la síntesis de esta, como son los betalactámicos, glucopéptidos, fosfomicina o bacitracina.
 - Modificación de la estructura de 16S rRNA en *M. genitalium*: disminuye su sensibilidad a las tetraciclinas.
 - Carencia de polisacáridos en la membrana celular: resistencia a polimixina A.
 - Carencia de enzimas para la síntesis de ácido fólico: resistencia a trimetoprim y sulfonamidas.
 - Mutaciones en la RNA polimerasa: resistencia a rifampicina.
- Resistencia adquirida: supone la adquisición de genes nuevos o adicionales mediante transferencia horizontal (elementos genéticos móviles adquiridos mediante transducción, conjugación o transformación, que normalmente se localizan fuera del cromosoma) o mutaciones que permiten a la bacteria tolerar concentraciones más elevadas de antibiótico que en la resistencia intrínseca. Las mutaciones puntuales *de novo* (SNP) de las dianas son el principal mecanismo de resistencia adquirida en este grupo.
- Resistencia adaptativa: se expresa en la bacteria como una resistencia a concentraciones subóptimas del antibiótico. En esta situación, tras el primer contacto con un antimicrobiano, los mecanismos de resistencia adaptativa pueden provocar un incremento temporal de la expresión de bombas de eflujo e inducir un estado de hipermutación y elevada variabilidad genética, influyendo en la

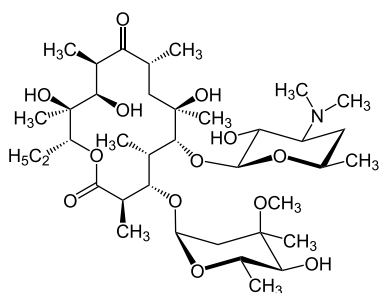
tolerancia, resistencia o persistencia de los microorganismos. Por ejemplo, el efecto de azitromicina en *M. genitalium* es limitado, dado que no alcanza concentraciones terapéuticas a nivel nuclear, que es donde se encuentra la bacteria. Las concentraciones subclínicas favorecen la aparición de resistencias adaptativas.

En el caso de los *Mollicutes*, la mayor parte de las resistencias están basadas en la modificación de las dianas antibióticas por mutaciones puntuales. Los antibióticos más empleados en su tratamiento son los macrólidos, quinolonas y tetraciclinas, aunque aminoglucósidos, lincosamidas y estreptograminas también actúan sobre este grupo de bacterias.

Los macrólidos y las quinolonas son la primera y segunda línea de tratamiento, respectivamente, en las infecciones causadas por *M. pneumoniae* y *M. genitalium*. Las tetraciclinas son parcialmente activas y no eliminan totalmente la bacteria, por lo que no son de elección salvo en casos muy concretos. Dada la aparición reciente de resistencias frente a ambas clases de antibióticos (en diferentes proporciones, según el país), su detección es crucial para la administración de un tratamiento adecuado al paciente. A continuación, vamos a profundizar en ambos tipos de resistencia y sus principales métodos de detección.

1.6.1.1. Resistencia a macrólidos

Los macrólidos son una familia de antibióticos que en su estructura química poseen un anillo lactónico de gran tamaño. Aunque se conocen más de 2000 compuestos de este tipo, el término macrólido se utiliza para aquellos antimicrobianos con anillo de 14, 15 o 16 átomos al que se unen, mediante enlaces glucosídicos, uno o varios azúcares neutros o básicos:



14 átomos	15 átomos	16 átomos
Claritromicina	Azitromicina	Diacetil-midecamicina
Eritromicina		Espiramicina
Roxitromicina		Josamicina

Figura 10: Estructura química de los macrólidos (izquierda). Clasificación de los macrólidos en función del número de átomos en su composición (derecha).

Los macrólidos inhiben la síntesis de proteínas por unión a la peptidiltransferasa de la subunidad 50S del ribosoma. Se unen de forma reversible al dominio V del RNA ribosómico mediante puentes de hidrógeno entre diferentes radicales hidroxilo del macrólido (especialmente entre el OH en posición 2' del azúcar desosamina) y determinadas bases del RNAr, especialmente A2058 y A2059 (numeración referida a *E. coli*), además del nucleótido G748 (dominio II) y las proteínas ribosomales L4 y L22. La telitromicina (ketólido, con un anillo de 14 miembros y una estructura 3-ceto en sustitución del fragmento L-cladinosa de los macrólidos y un sustituyente metoxi en C6) posee una afinidad aún mayor por el ribosoma, lo que hace que su actividad sea más potente. Tanto macrólidos como ketólidos inhiben el orificio de entrada al canal por donde sale la proteína del ribosoma (150), causando una disociación prematura del peptidil-RNA^t y bloqueando, por tanto, la síntesis proteica (151).

La diferencia de eficacia observada entre los distintos macrólidos es difícil de explicar, ya que su mecanismo de acción a nivel molecular no está totalmente claro.

Su actividad antibacteriana es lenta, tiempo-dependiente y con efecto post-antibiótico. Generalmente actúan como bacteriostáticos, pero a concentraciones elevadas, frente a determinados microorganismos o en medio alcalino pueden comportarse como bactericidas. Además, poseen un efecto antiinflamatorio beneficioso en el tratamiento de muchas patologías (150).

Existen dos modalidades por las que las bacterias adquieren resistencia a los macrólidos, como son las sustituciones nucleotídicas puntuales (SNPs) o la metilación del rRNA en las posiciones en las que se une el antibiótico (2058 y 2059). *M. pneumoniae* y *M. genitalium* carecen de las enzimas necesarias para la metilación, por lo que la resistencia adquirida se debe únicamente a SNPs. Estas mutaciones se producen preferentemente en las posiciones 2058 y 2059, y confieren resistencia de alto nivel a macrólidos de 14 y 15 átomos. Los macrólidos de 16 átomos sí que se ven muy afectados por las mutaciones en 2059, pero muestran resistencia intermedia en el caso de la posición 2058. En general, las sustituciones en las posiciones 2062 y 2611 (esta última, descrita únicamente en *M. pneumoniae*), que confieren resistencia de bajo nivel a estos antimicrobianos.

La transición A2058G es la más común asociada a resistencia a macrólidos, aunque otro tipo de mutaciones han sido descritas en dicha posición (A2058C, A2058T), en 2059 (A2059G, A2059C), en 2062 (A2062G) y en 2611 (C2611G, C2611A) (152, 153).

A nivel del dominio II del rRNA 23S no se han detectado mutaciones hasta el momento. Otra de las dianas de los macrólidos son las proteínas ribosomales L4 y L22. Todos los cambios descritos en L4 se encuentran en un bucle desordenado altamente conservado de la proteína, siendo el principal sitio de unión del RNAr de la proteína ribosomal, y parece que la resistencia podría estar causada por un cambio conformacional de la diana de unión de los macrólidos. En el caso de L22, solo se detectaron cambios en mutantes seleccionados por telitromicina, en las que sustituciones aminoacídicas concretas (prolina 91 y alanina 93, previamente descritas en *Streptococcus pneumoniae*) causan un ligero incremento de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de estos antibióticos (154). En ambos casos se han descrito mutaciones tanto *in vitro* (154) como *in vivo* (155), pero su impacto real en la resistencia a macrólidos no está claro en la actualidad.

Otros antibióticos, como las combinaciones de estreptograminas, quinupristina-dalfopristina, pristinamicina y solitromicina (ketólido), mantienen su actividad en mutantes resistentes que poseen sustituciones en 2058, 2059 y 2611, pero la concentración mínima inhibitoria de las combinaciones de estreptogramina aumenta en las cepas portadoras de la mutación A2062G (154).

Además de las mutaciones, la ubicación de la bacteria en la célula también influye en su resistencia a este grupo de antibióticos. *M. genitalium* se encuentra localizado en el núcleo de las células epiteliales, a diferencia de *M. pneumoniae*, que se encuentra en el citoplasma y región perinuclear. Esta posición le proporciona un mayor nivel de resistencia, ya que a pesar de que antibióticos como la azitromicina penetren adecuadamente en las células eucarióticas, se acumulan mayoritariamente en el citoplasma y solo concentraciones bajas se observan en el núcleo, lo que provoca no solo eficacia reducida, sino inducción de resistencias (153).

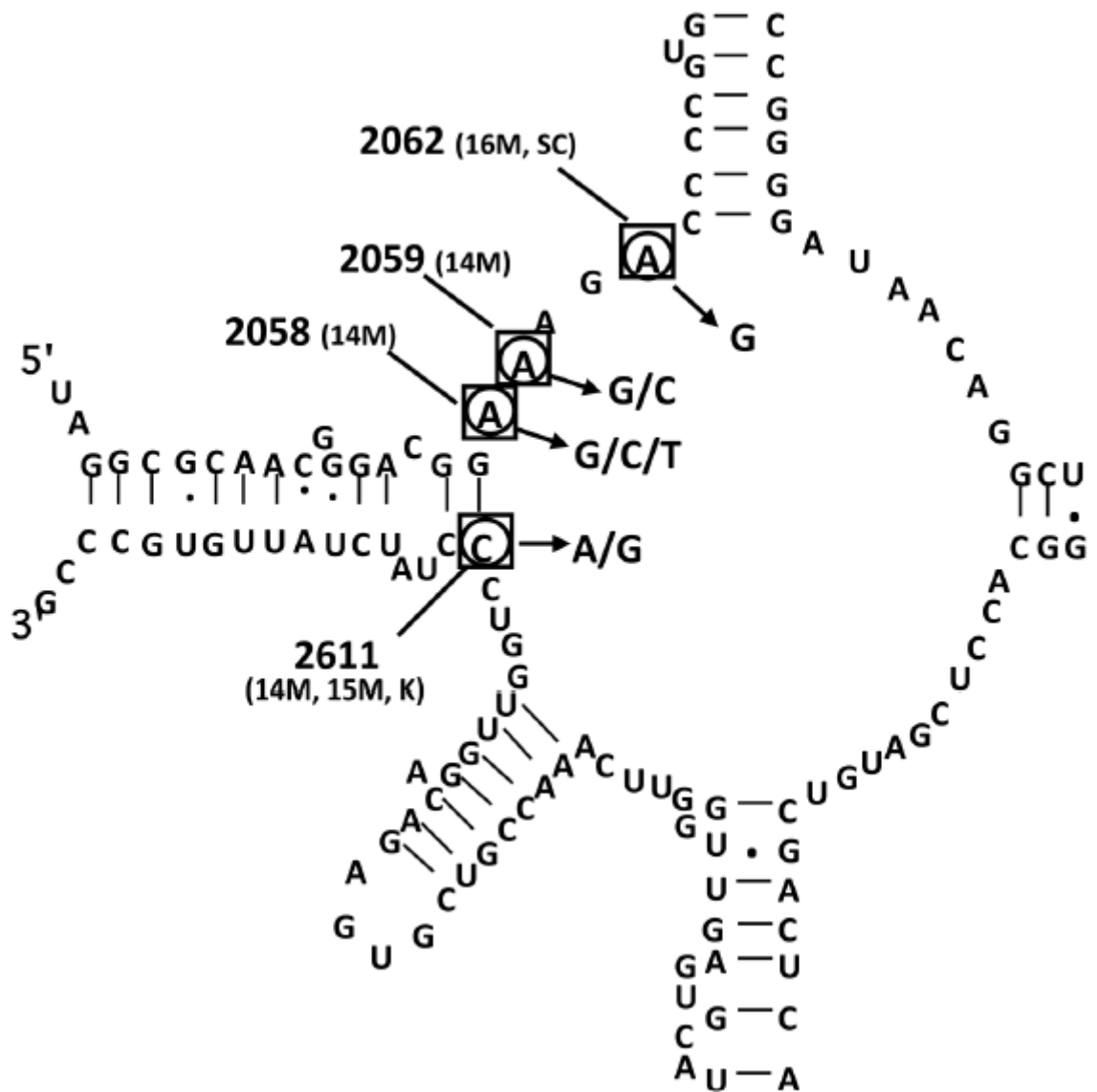


Figura 11: Loop de la peptidiltransferasa del dominio V del rRNA 23S de *M. pneumoniae* (numeración universal de *E. coli*). Se señalan mediante un cuadrado los principales nucleótidos con mutaciones asociadas a resistencia a macrólidos encontrados tanto tras la selección de cepas *in vitro*, y las posiciones redondeadas las encontradas en muestras clínicas. Los antibióticos utilizados para la selección de resistencias *in vitro* aparecen entre paréntesis (14M-macrólidos de 14 átomos, 15M-macrólidos de 15 átomos, 16M-macrólidos de 16 átomos; SC: estreptogramina; K: ketólidos)

Extraído de: Pereyre S, Goret J, Bébéar C. *Mycoplasma pneumoniae*: current knowledge on macrolide resistance and treatment. *Front Microbiol* 2016;7:974.

Para la detección de mutaciones asociadas a la resistencia a macrólidos existen diversas técnicas realizables a partir de muestra directa, con objeto de evitar el cultivo complejo y lento de esta bacterias. Además de la amplificación y secuenciación de los *hotspots* (posiciones donde habitualmente se encuentran las mutaciones) del 23S rRNA, se han

desarrollado tanto técnicas caseras como comerciales, como son los Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) (156), PCRs a tiempo real y análisis de curvas de *melting* (157) o HRM (*High Resolution Melt*) (158), PCR anidada (*nested*) asociada a electroforesis capilar y polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (159), PCR para detección de SNPs (160) y pirosecuenciación, técnica que explicaré más adelante por ser la utilizada para detección de resistencias en esta tesis.

Además de todas las técnicas caseras descritas previamente, en los últimos años se han comercializado múltiples reactivos que permiten la detección tanto del microorganismo como de las principales mutaciones asociadas a resistencia a macrólidos. Este gran avance en poco tiempo ha estado condicionado por el potencial de adquisición de resistencias *M. genitalium*, que lo postula como una posible superbacteria resistente a todos los tratamientos en un futuro próximo. La mayor parte de las técnicas solamente están disponibles para esta especie y profundizaremos en ellas en un apartado posterior. En el caso de *M. pneumoniae*, aunque países como China se han reportado entre un 90-100% de cepas resistentes a macrólidos, la infección en niños frecuentemente se resuelve sin problemas independientemente de la sensibilidad de la cepa y muchas veces incluso sin tratamiento antibiótico. Esto conlleva también un infradiagnóstico de la patología, y por estos motivos, la comercialización de este tipo de herramientas no es tan habitual. Recientemente se han evaluado algunos reactivos para realizar de forma comercial el estudio de *M. pneumoniae* junto a su patrón de resistencia a macrólidos (161, 162).

1.6.1.2. Resistencia a quinolonas

Las quinolonas son un grupo de antibióticos cuya estructura química está formada por dos anillos, con un nitrógeno en la posición 1, un grupo carbonilo en la posición 4 y un grupo carboxilo en la posición 3. Su espectro y su potencia aumentan de forma considerable cuando incluyen un átomo de flúor en posición 6, ya que mejora la penetración en los tejidos y la unión a topoisomerasas bacterianas. Su biodisponibilidad es muy buena por vía oral, entre un 50% y en su mayoría cercana al 100%.

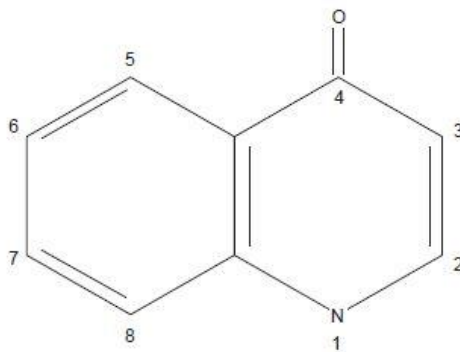


Figura 12: Estructura química de las quinolonas. Imagen extraída de: Alós, J-I. Quinolonas. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2009;27(5):290–297

En función de su espectro, se clasifican en generaciones: las de primera generación (ácido nalidíxico, ácido pipemídico) son poco usadas en la actualidad, y tienen actividad frente a enterobacterias y algún otro gramnegativo. Su uso quedaba prácticamente restringido a infecciones de orina. A partir de la segunda generación, todas las moléculas incluyen el flúor (de ahí su nombre, fluoroquinolonas). En la segunda generación encontramos al norfloxacin, utilizado en infecciones localizadas, y con mayor actividad que las previas frente a gramnegativos, *P. aeruginosa* y algunos patógenos atípicos, aunque en grampositivos su actividad es moderada y frente a anaerobios es nula. De tercera generación (ciprofloxacino, ofloxacino, levofloxacino) presentan mayor absorción por vía oral y mejoran su actividad frente a *P. aeruginosa*, grampositivos y patógenos atípicos. Las de cuarta generación (moxifloxacino) aportan una mayor actividad frente grampositivos y buena frente a anaerobios, aunque menor frente a *P. aeruginosa* (163).

Tabla 12: Clasificación evolutiva de las quinolonas.

1ª generación	2ª generación	3ª generación	4ª generación
Ácido nalidíxico Ácido pipemídico	Norfloxacino	Ciprofloxacino Levofloxacino Ofloxacino	Moxifloxacino

Su mecanismo de acción es complejo. Actúan sobre el DNA cromosómico, uniéndose a las topoisomerasas de tipo II bacterianas (enzimas encargadas de los enrollamientos y desenrollamientos cromosómicos durante la síntesis del DNA, con actividad en la transcripción, replicación y división celular) e inhibiendo su acción. Entre ellas, destacan la DNA-girasa (principal diana de las quinolonas en gramnegativos) y la topoisomerasa IV (principal diana en grampositivos).

La actividad bactericida de esta clase de antibióticos se debe a la reparación incompleta, la falta de respuesta SOS y el bloqueo de la replicación del DNA. El propio mecanismo de acción de las quinolonas incrementa la frecuencia de mutaciones en el material genético bacteriano, llevando a la acumulación de SNPs en ambas enzimas y contribuyendo a la emergencia de cepas resistentes (149).

La presencia de mutaciones en los genes que codifican la DNA girasa (*gyrA*, *gyrB*) o la topoisomerasa IV (*parC* y *parE*) se ha relacionado con la resistencia a fluoroquinolonas tanto en *M. pneumoniae* como en *M. genitalium*, ya que causarían un cambio conformacional en ambas enzimas disminuyendo la afinidad por su diana de las quinolonas, y, por tanto, su eficacia. Los genes más frecuentemente afectados son *gyrA* y *parC*, y dentro de ellos existen unas regiones conocidas como QRDR (*quinolone resistance determining regions*), que contienen las posiciones más propensas a sufrir mutaciones (*hotspots*). Estos *hotspots* corresponden principalmente a la serina presente en la posición 83 (Ser83-S83) y al ácido aspártico en la posición 87 (Asp87, D87) de ambos genes, en los que una mutación puntual conlleva al cambio del aminoácido codificado por la proteína y a la generación de resistencia, aunque se han descrito otras posiciones mutadas dentro de los QRDRs que contribuyen igualmente a la resistencia (164).

El nivel de resistencia suele ser superior a mayor número de mutaciones presentes en un gen individualmente o con la presencia de mutaciones en ambos genes de manera simultánea.

La detección de resistencia a quinolonas se ha realizado clásicamente por secuenciación de los genes afectados (*parC* y *gyrA* habitualmente). La secuenciación permite la detección de mutaciones ya descritas en estas regiones, como el estudio de nuevas mutaciones que puedan estar implicadas en la resistencia a quinolonas. Este estudio es de gran interés, especialmente en *M. genitalium*, dado que moxifloxacino supone la segunda línea de tratamiento en las infecciones causadas por este microorganismo. La alta prevalencia de cepas resistentes a macrólidos en Asia ha llevado a un mayor uso de la segunda línea, lo que está generando un mayor número de casos de resistencia a quinolonas a nivel mundial (164-169). En el caso de *M. pneumoniae*, la mayor parte de las infecciones se produce en niños y las quinolonas no están recomendadas, a priori, en este grupo de edad. Sin embargo, en países como Japón, se aprobó hace unos años el uso de tosufloxacino, dada la elevadísima tasa de resistencia a macrólidos registrada en *M. pneumoniae* (140).

Este aumento de resistencia plantea a los laboratorios la necesidad de detectar la resistencia a quinolonas de una manera rápida en aquellos casos en los que se detecte

una cepa resistente a macrólidos o en los fracasos en el tratamiento con quinolonas. Tal como referíamos previamente, la detección de mutaciones se lleva a cabo de forma habitual por secuenciación, pero la rapidez requerida ha hecho que recientemente se hayan comenzado a diseñar técnicas caseras (170) o comercializar algunos reactivos (171-173) que permiten la detección de *M. genitalium* junto con las mutaciones asociadas a resistencia a quinolonas más frecuentes.

En el caso de las técnicas caseras, recientemente se ha publicado un método molecular desarrollado en Australia, donde hasta un 30% de cepas resistentes a macrólidos poseen alguna mutación del gen *parC* relacionada con la resistencia a quinolonas, basado en sondas de hibridación y temperaturas de melting. Este ensayo permite distinguir con alta especificidad entre cepas salvajes y mutantes por las diferencias en la temperatura de melting detectadas entre ellas (las cepas mutantes en las posiciones 83 y 87 poseen una temperatura de melting 2-3°C inferior respecto a las cepas salvajes) (170).

Asimismo, se han publicado recientemente diversas evaluaciones del kit desarrollado por SpeeDx® (próxima comercialización) para la detección de *M. genitalium* y las 6 mutaciones del gen *parC* asociadas a resistencia a moxifloxacino más frecuentes: S83I (G248T), S83R (A247C), S83N (G248A), D87Y (G259T), D87H (G259C), y D87N (G259A) (171-173).

La compañía coreana Seegene también ha comercializado recientemente un kit similar, que detecta también de forma simultánea la presencia de *M. genitalium* y las seis mutaciones referidas anteriormente (174).

Los resultados obtenidos son prometedores, y la rapidez de sus resultados facilitaría el manejo de aquellos pacientes infectados con cepas resistentes a macrólidos que necesitan recibir una terapia adicional para curar su infección, ya sea una fluoroquinolona o un tratamiento alternativo, como pristinamicina o doxiciclina.

1.6.1.3. Técnica de pirosecuenciación para la detección de mutaciones asociadas a resistencia a macrólidos

La pirosecuenciación fue descrita por primera vez en 1985 (175). Está basada en el principio de “secuenciación por síntesis”, en la que la adición secuencial de nucleótidos a una cadena sencilla unida a un cebador permite deducir la secuencia del fragmento a estudio por el orden en que los diferentes nucleótidos se van incorporando a la cadena sintetizada, la cual es complementaria de la secuencia diana.

La síntesis de DNA se monitoriza a tiempo real, mediante un sistema enzimático en el que la síntesis del DNA se detecta por bioluminiscencia. Su principal utilidad es la secuenciación de fragmentos de pequeño tamaño en búsqueda de SNPs de forma rápida y semiautomatizada (176).

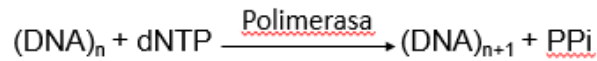
Las cuatro enzimas que participan en el proceso son:

- Fragmento Klenow de la DNA polimerasa I: fragmento que conserva la actividad polimerasa, pero no la de exonucleasa (reparación de errores), permitiendo de esta forma emparejamientos asincrónicos.
- ATP sulfurilasa: responsable de utilizar el pirofosfato (PPi) liberado tras la unión de un nucleótido a la secuencia para sintetizar ATP (adenosin trifosfato) por unión a un nucleótido monofosfato (adenosin monofosfato, AMP).
- Luciferasa: convierte la luciferina en oxiluciferina consumiendo el ATP sintetizado previamente. Esta reacción genera un pico de luz.
- Apirasa: actúa eliminando los nucleótidos no añadidos y los restos de ATP entre la adición de bases para evitar reacciones inespecíficas.

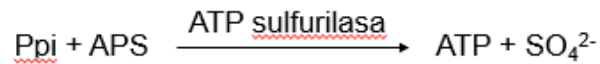
La mezcla de reacción contiene también los sustratos enzimáticos adenosin fosfosulfato (APS), D-luciferina y el fragmento a secuenciar unido a un primer, que será empleado como material inicial de la DNA polimerasa.

Este proceso es sencillo: a partir de la cadena sencilla de una secuencia de DNA diana, se irá sintetizando su complementaria por medio de una DNA polimerasa. Las cuatro bases se van dispensando de forma cíclica (el número de ciclos va en relación con el tamaño del fragmento a secuenciar) en un orden preestablecido por el usuario (en función de la secuencia esperada). En caso de que la base dispensada sea complementaria al fragmento de interés, se unirá desencadenando todo el proceso enzimático. El pico de luz generado será detectado por una cámara con un dispositivo de carga acoplada. En caso de no ser la base esperada, todos los residuos serán eliminados mediante la apirasa de forma previa a la dispensación de la siguiente base (177):

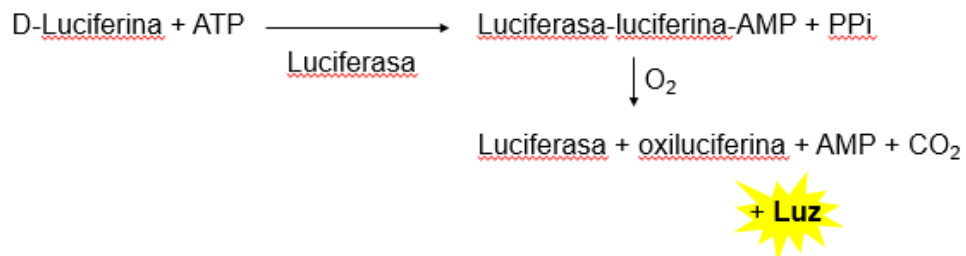
1. Polimerización del DNA: se produce cuando el nucleótido añadido es complementario a la secuencia diana y se incorpora a la misma.



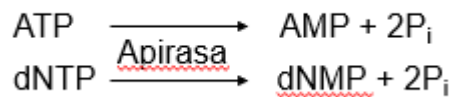
2. Síntesis de ATP: el pirofosfato inorgánico liberado sirve como sustrato de la ATP sulfurilasa, que sintetiza ATP.



3. Producción de luz: en la tercera y cuarta reacción, el ATP es convertido en luz por la luciferasa y la señal es detectada. Por tanto, el pico de luz se producirá únicamente si el nucleótido correcto se añade a la mezcla.



4. Degradación de componentes: la apirasa elimina los nucleótidos y el ATP no incorporados entre la adición de bases. Esta degradación es crucial para asegurar que la señal luminosa corresponde con el nucleótido añadido en cada paso.



Un ejemplo del desarrollo de este proceso se muestra en **la Figura 13**:

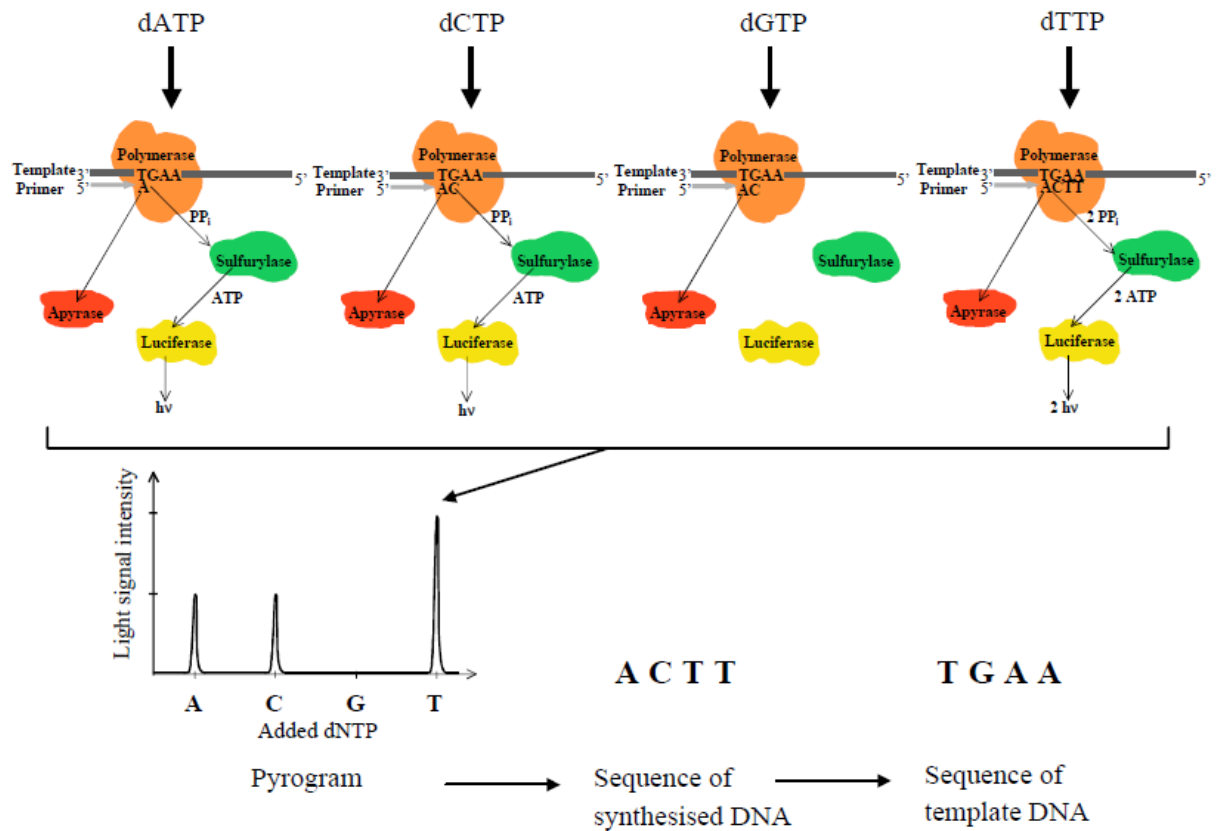


Figura 13: Representación del sistema de pirosecuenciación. Si el dNTP añadido es complementario a la base presente en la secuencia madre, la polimerasa lo añade liberando pirofosfato (PPi). La ATP sulfurylase convierte en PPi en ATP, el cual sirve de sustrato de la luciferasa para la producción de luz. Este pico de luz es detectado, confirmando la incorporación de ese dNTP a la secuencia.

Extraída de: Ahmadian A, Ehn M, Hober S. Pyrosequencing: History, biochemistry and future. Clinica chimica acta. 2006;363(1):83-94.

La realización de este proceso automático se lleva a cabo en un pirosecuenciador, en nuestro caso, Pyromark™ Gold Q96 MD sequencer (Biotage, Sweden):



Figura 14: Pirosecuenciador (exterior e interior del equipo). Imagen extraída de: Pyrosequencing - the synergy of sequencing and quantification (web: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=8e386d5a-08b7-4bae-bf0f-f38fcd84b9ff&lang=en>, visitada el 13/04/2022)

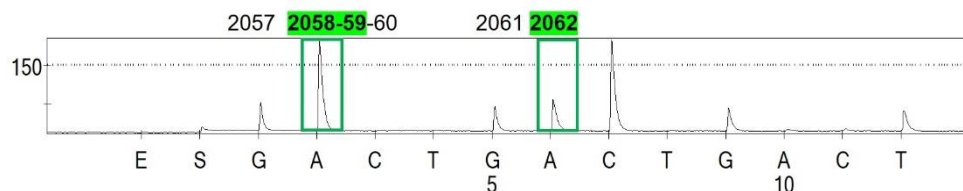
Para el estudio la presencia de mutaciones asociadas a resistencia a macrólidos, los pasos a seguir son los siguientes:

- 1) Amplificación de la región de interés: la pirosecuenciación se emplea en fragmentos pequeños concretos. A partir del extracto de DNA de la muestra positiva para *M. pneumoniae* /*M. genitalium*, se realiza una PCR (en el caso de *M. pneumoniae*, se realizó una PCR *nested* para aumentar la sensibilidad), en la que uno de los cebadores debe ser biotinilado. Este proceso amplifica la región a estudio que contiene las posiciones propensas al cambio (posiciones calientes - “*hotspots*”, 2058, 2059 y 2062 para ambas especies, o la posición 2611 para *M. pneumoniae*, refiriendo la numeración a *E. coli*). Tras esta reacción, obtendremos un producto de PCR de tamaño reducido (≈ 165 pb en MP y ≈ 147 pb en *M. genitalium*), que contendrá biotina.
- 2) Inmovilización del producto de PCR sobre las microesferas: los productos de la PCR biotinilados se inmovilizan sobre microesferas de sefarosa recubiertas con estreptavidina. Se preparará una mezcla que contiene las microesferas, un tampón de unión (*binding buffer*), agua y de 5-20 μ L de producto de PCR. Esta combinación se dispensa en tubos o placa de PCR, se tapa, y se agita 10 minutos en un agitador a 1400 rpm.
- 3) Separación de las cadenas de DNA y liberación de las muestras en la placa de pirosecuenciación: tras la agitación, utilizaremos el peine de vacío del pirosecuenciador para retener las microesferas (que estarán unidas al DNA a estudiar por la unión estreptavidina-biotina) y desechar el resto de los reactivos. Una vez recogidas las esferas en el peine, realizaremos una serie de lavados, primero con etanol, luego con solución de desnaturalización y finalmente con buffer de lavado. Una vez completado este proceso, anularemos el vacío para dispensarlas en una placa de PCR, en la que habremos puesto una mezcla de buffer de anillado (*annealing buffer*) y del cebador de pirosecuenciación.

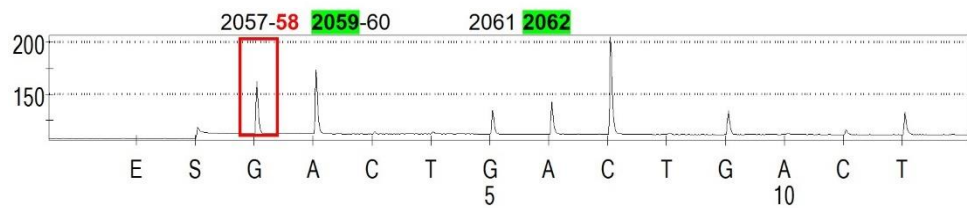
- 4) Annealing del cebador de secuenciación con las muestras: para que el cebador de secuenciación se una a la secuencia a estudio, calentaremos la placa a 80°C durante 2 minutos y luego la dejaremos enfriar a temperatura ambiente.
- 5) Preparación de reactivos del pirosecuenciador: este instrumento utiliza un cartucho de reactivos, en el que se añaden el complejo enzimático, el sustrato, y las bases nitrogenadas para la reacción de pirosecuenciación. Una vez preparado, introduciremos tanto el cartucho como la placa de PCR en el equipo, y podremos iniciar el proceso. La duración de la reacción es directamente proporcional al número de muestras procesadas.
- 6) Lectura e interpretación de resultados: una vez finalizado el proceso, el equipo nos facilitará la secuencia en formato FASTA y el pirograma obtenido para su interpretación. A continuación, mostramos algunos ejemplos:

M. pneumoniae

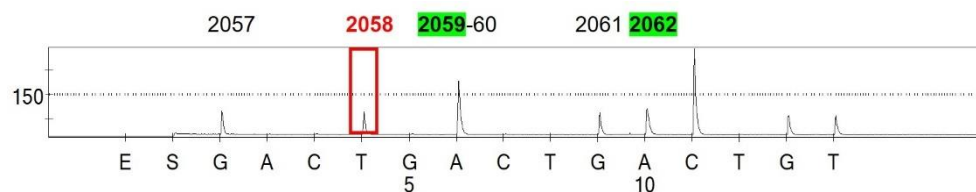
Cepa wild type, región 1: la pirosecuenciación se inicia en la guanina situada en posición 2057 (2062 en la numeración de *M. pneumoniae*). La secuencia original es **GAAGACCCCGT**, correspondiendo las letras marcadas en verde a los hotspots donde se encuentran las principales mutaciones asociadas a resistencia a macrólidos (2058, 2059 y 2062, correspondientes a 2063, 2064 y 2067 en numeración de *M. pneumoniae*).



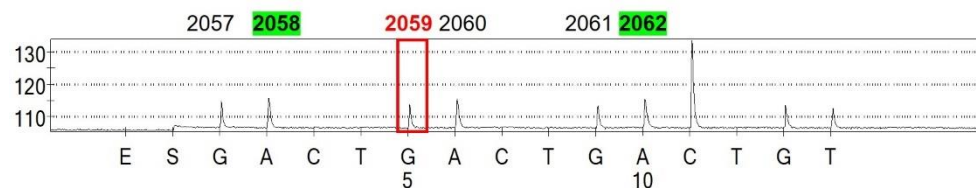
Cepa con mutación A2058G (GGAAGACCCCGT): podemos observar como el pico de guanina inicial doble su tamaño, mientras que el pico de adenina disminuye su altura. Esto significa que se han unido 2 guaninas al inicio en lugar de una.



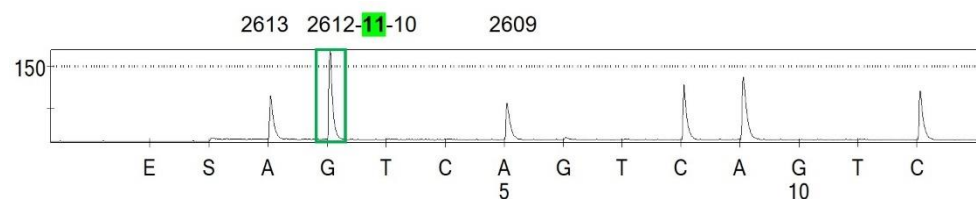
Cepa con mutación A2058T (GTA**AGACCCCGT):** aparece un pico de timina no presente en cepa wild type, disminuyendo en su altura el pico de adenina posterior. Esto significa que la adenina en posición 2058 ha sido sustituida por una timina.



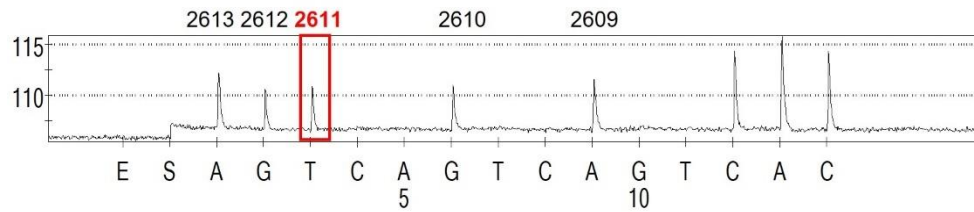
Cepa con mutación A2059G (GAG**AGACCCCGT):** el triple pico de adenina 2058-2060 se desdobra en tres picos diferentes (adenina-guanina-adenina), implicando una mutación en la posición 2059.



Cepa wild type, región 2: la pirosecuenciación se inicia en la guanina situada en posición 2619. La secuencia original es AG**G**GACCAACC (en este caso, secuenciamos la cadena complementaria, correspondiendo con una secuencia madre de TCC**C**CTGGTTGG). La letra marcada en verde es la posición 2611 (2617 en la numeración de *M. pneumoniae*), asociada con resistencia a macrólidos.

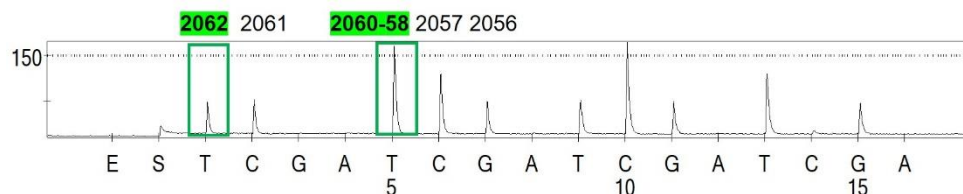


Cepa con mutación C2611A (AGTG**ACCAACC):** lo que era un pico de 3 guaninas, se desdobra en tres picos (guanina-timina-guanina).

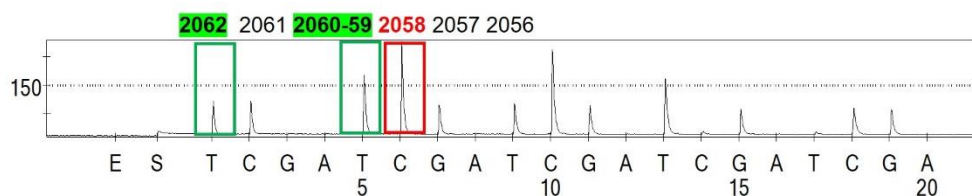


M. genitalium

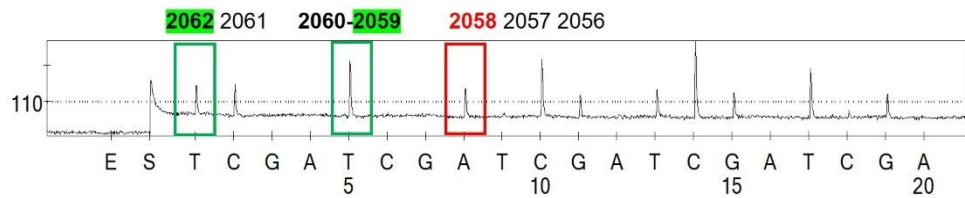
Cepa wild type: en este caso también secuenciamos la cadena complementaria de la zona de interés (TCT**T**CCGTCCCGTTG, secuencia madre **AGAA**GGCAGGGCAAC), que incluye las 3 posiciones en las que habitualmente se encuentran las mutaciones asociadas a resistencia a macrólidos. El proceso lo iniciamos en la posición 2062:



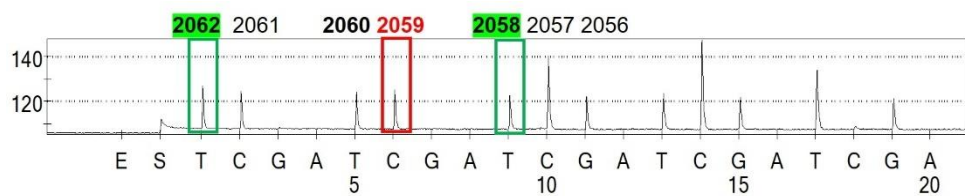
Cepa con mutación A2058G: el pico de guanina 2060-2058 disminuye su tamaño en favor del pico de citosina. Esto significa que la timina situada en 2058 ha sido sustituida por una citosina (TCT**T**CCGTCCCGTTG).



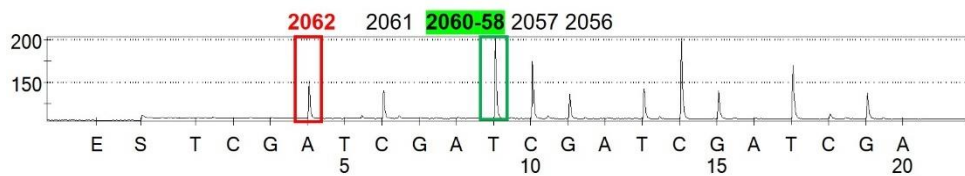
Cepa con mutación A2058T: el pico de guanina 2060-2059 disminuye su tamaño con aparición de un nuevo pico de adenina. Esto significa que la timina situada en 2058 ha sido sustituida por una adenina (TCT**T****A**CCGTCCCGTTG).



Cepa con mutación A2059G: el pico triple de timina en 2060-2058 se desdobra en 3 picos (timina-citosina-timina). Esto significa que la timina situada en 2059 ha sido sustituida por una citosina (TCT**C**TCCGTCCCGTTG).



Cepa con mutación A2062T: la timina inicial ha sido sustituida por una adenina. Esto significa que en la secuencia original existe una timina en esa posición en lugar de una adenina (A**C**TTTCCGTCCCGTTG):



El pico de luz obtenido es directamente proporcional a la cantidad de bases añadidas, lo que hace que las diferencias de altura en un pico o la aparición de nuevos picos no presentes en la cepa salvaje nos permitan identificar las mutaciones.

Una característica importante de la pirosecuenciación es que permite secuenciar fragmentos de hasta 20 bases de longitud. Esto permite su aplicación en diversos campos como son la detección de mutaciones no conocidas en hotspots, el estudio de SNPs, el genotipado bacteriano (secuenciación región variable del rRNA 16S) o viral (estudio de mutaciones asociadas a resistencia a antivirales), o la secuenciación de marcadores de secuencia expresada (*tag sequencing*), que son pequeñas subsecuencias de una

secuencia nucleotídica transcrita (codificante de una proteína o no), que se emplean para identificar genes que se transcriben (177).

1.6.1.4. Técnicas comerciales para la detección de resistencia a macrólidos en *M. genitalium*

Tal como referíamos anteriormente, existen numerosos reactivos comercializados en los últimos años para la detección de resistencias en *M. genitalium*.

Estos kits pueden ser de un solo paso (de aparición más reciente, que permiten detección simultánea de la bacteria y de su patrón de resistencia a macrólidos) o de dos pasos (los primeros comercializados, en los que en primer lugar se realiza una PCR que detecta la presencia del microorganismo y, en caso de ser positiva, posteriormente se lleva a cabo el estudio de resistencias). Existe una gran variedad de kits comerciales con este objetivo (178-181), que incluyen todas las modalidades mencionadas anteriormente. En su mayoría muestran una elevada sensibilidad y especificidad tanto en la detección de *M. genitalium* como de las principales mutaciones asociadas a resistencia a ML, difiriendo en el tiempo requerido hasta la obtención de un resultado, volumen de muestra necesario para el estudio, número de mutaciones detectadas o la necesidad de un equipamiento específico para su realización. En la **Tabla 13** podemos ver un resumen de los kits más conocidos en este campo.

Tabla 13: Principales técnicas comerciales para la detección de resistencia a macrólidos en *M. genitalium*. Adaptada a partir de: Le Roy C, Bebear C, Pereyre S. Clinical Evaluation of Three Commercial PCR Assays for the Detection of Macrolide Resistance in *Mycoplasma genitalium*. Journal of clinical microbiology. 2020;58(2) y Le Roy C, Bebear C, Pereyre S. Performance of Three Commercial Molecular Diagnostic Assays for the Simultaneous Detection of *Mycoplasma genitalium* and Macrolide Resistance. Journal of clinical microbiology. 2021;59(6).

Parámetro	S-DiaMGRes (Diagenode)	Real Accurate TVMGres (Pathofinder)	Resistance Plus MG (SpeedX)	Allplex MG & AziR (Seegene)	Macrolide-R/MG ELITe MGB (ELITech)	Resistance Plus MG FleXible (SpeedX)
Diana de detección	Gen Mg219	Gen MgPa	Gen adhesina MgPa	No publicado	Gen 23S rRNA	Gen adhesina MgPa
Mutaciones resistencia ML detectadas	5, A2058G/C/T A2059G/C	4, A2058G/C/T A2059G	5, A2058G/C/T A2059G/C	6, A2058G/C/T A2059G/C/T	5, A2058G/C/T A2059G/C WT	4, A2058G/C/T A2059G
Volumen de muestra necesario (µL)	162	162	162	200	200	1000

Eluído DNA disponible para otras pruebas	Sí					No
Control interno amplificación MG/23S rRNA	Sí/No*				Sí/Sí	Sí/No*
Automatización	Amplificación	Amplificación	Amplificación y análisis	Amplificación y análisis	Completa (extracción, amplificación y análisis)	Cartucho (extracción y amplificación) y análisis
Tipo y nº de reacciones por run	Lotes, hasta 94 muestras/run				Lotes, 12 muestras*	Individual, hasta 16 test simultáneos de distintas técnicas (según equipo)
Tiempo de ejecución manual (min)	30-60, según nº muestras				30	20
Tiempo hasta resultado	1h 45' (excluyendo extracción)	1h 35' (excluyendo extracción)	1h 25' (excluyendo extracción)	1h 45' (excluyendo extracción)	3h incluyendo extracción	2h incluyendo extracción
Equipamiento	LC480/7500 Fast/CFX 96	LC480/Rotor-Gene/PathoCycler	LC480/7500 Fast/CFX 96	CFX 96	ELITE InGenius	Cepheid GeneXpert
Software análisis resultados	Roche LC480	Roche LC480	UgenTec FastFinder	Seegene Viewer	ELITE InGenius	GeneXpert Dx system

* El control interno es exógeno (se añade de forma adicional) en todos los kits excepto en Seegene y ELITech, que llevan un control interno endógeno y requieren de la adición de un control exógeno en las muestras de orina.

** Posibilidad de ejecutar distintas técnicas en el equipo de forma simultánea.

Todos los kits expuestos en la tabla son reactivos de un solo paso, ya que han desplazado a las primeras versiones que ofrecían una detección de resistencias en una PCR independiente a realizar tras la detección de *M. genitalium*. Entre ellos, la mayoría requiere la extracción de material genético en primer lugar, para luego realizar la amplificación, con excepción del kit de Elitech (el equipo requerido realiza el proceso completo desde la introducción de la muestra) y la adaptación para GenXpert de SpeedX, que se trata de un cartucho tipo “point-of-care” que realiza tanto la extracción como la amplificación con un equipo sencillo y una manipulación muy escasa.

Una de las principales desventajas que presentan todos los kits excepto el de Elitech es que el control interno que incluyen solo monitoriza la detección de *M. genitalium*, pero no existe uno adicional que controle la amplificación del gen 23S rRNA para la detección de resistencias. Esto implica que los resultados obtenidos pueden ser de “cepa mutante” o de “cepa sin mutación detectada”, pero esto no significa necesariamente que la cepa a estudio sea wild-type, si no que no se han detectado mutaciones (bien por no estar incluidas en las mutaciones diana del reactivo o bien porque no ha amplificado el gen, sin capacidad de distinción). Por tanto, si existe un fracaso terapéutico en un paciente al que se le ha diagnosticado una cepa supuestamente “sensible”, la presencia de una mutación asociada a resistencia a ML debe ser sospechada y la cepa debe ser estudiada por técnicas adicionales (178, 179, 182). Además, ninguno de los kits anteriores incluye la detección de mutaciones en la posición 2062 (numeración de *E. coli*), por lo que esta posibilidad tampoco debe ser excluida.

De los métodos mencionados anteriormente, en esta tesis se ha evaluado el kit ResistancePlus® MG (SpeedX). Se trata de una técnica comercial de un solo paso, la cual hemos comparado con la pirosecuenciación, como técnica casera de referencia en dos pasos.

Este kit detecta simultáneamente *M. genitalium* y 5 mutaciones en las posiciones 2058 y 2059 en el gen 23S rRNA (numeración de *E. coli*) que están asociadas a la resistencia a la azitromicina. Es un ensayo multiplex de PCR en tiempo real (qPCR) de 1 pocillo que consta de 3 lecturas. La lectura 1 indica la presencia o ausencia de *M. genitalium* mediante la detección del gen MgPa; la lectura 2 indica la presencia de una mutación A2058G, A2059G, A2058T, A2058C o 2059C en el gen 23S rRNA; la lectura 3 es un control interno para supervisar la eficacia de la extracción y la inhibición de la qPCR. Este kit utiliza las

tecnologías PlexZyme® y PlexPrime® para ofrecer una capacidad superior de especificidad y multiplexado.

PlexPCR® es una novedosa tecnología de qPCR que utiliza enzimas PlexZyme® que detectan el producto amplificado e informan de su presencia generando una señal fluorescente. Estas enzimas son complejos de DNA catalíticos formadas por dos oligonucleótidos de DNA (“enzimas parciales”), que tienen una región específica de diana, un núcleo catalítico y una región de unión de una sonda universal. Cuando la diana está presente, las dos enzimas parciales se unen adyacentemente para formar el complejo PlexZyme® activo, con una actividad catalítica que descompondrá una sonda etiquetada. Al descomponerse, se produce una señal fluorescente que puede determinarse en tiempo real. Los enzimas PlexZyme® tienen una mayor especificidad que otras tecnologías de detección, ya que la unión para la detección requiere que se unan dos enzimas parciales. Además, son también enzimas de recambio múltiple, pudiendo descomponerse varias sondas durante cada ciclo de PCR, lo que produce una señal fuerte y sensible.

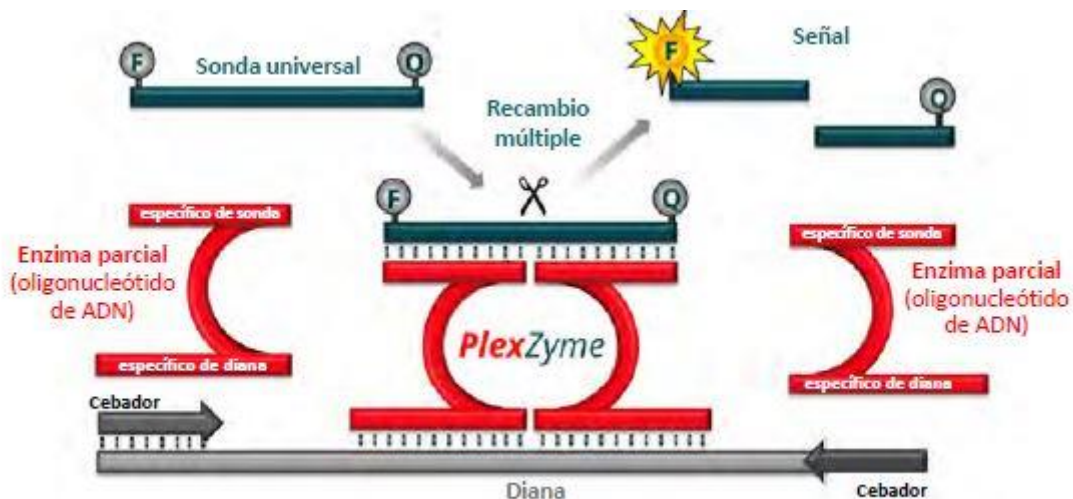


Figura 15: Tecnología PlexZyme® de SpeeDx. Imagen extraída del insert de la técnica.

El kit ResistancePlus® MG también emplea cebadores PlexPrime® para la amplificación específica de secuencias de mutaciones, junto a la detección de mutaciones específicas PlexZyme®. Estos poseen tres regiones funcionales:

- Región larga 5': fija el cebador a una ubicación determinada
- Región corta 3': se dirige selectivamente a la extensión desde la base mutante.
- Secuencia de inserción: localizada entre las regiones 5' y 3', actúa como una estructura de unión que inserta la estructura independiente de la diana en el amplicón resultante y aumenta la presión selectiva de la región 3'.

En un ensayo multiplex, cada cebador PlexPrime® se destina a una determinada base mutante e incorporará una secuencia de inserción única, lo que produce secuencias del amplicón mutante diferenciadas. A diferencia de otras tecnologías de detección basadas en sonda, el enzima PlexZyme® se puede solapar con el cebador PlexPrime® para dirigirse al amplicón mutante específico que contiene la base mutante y la secuencia de inserción incorporada.

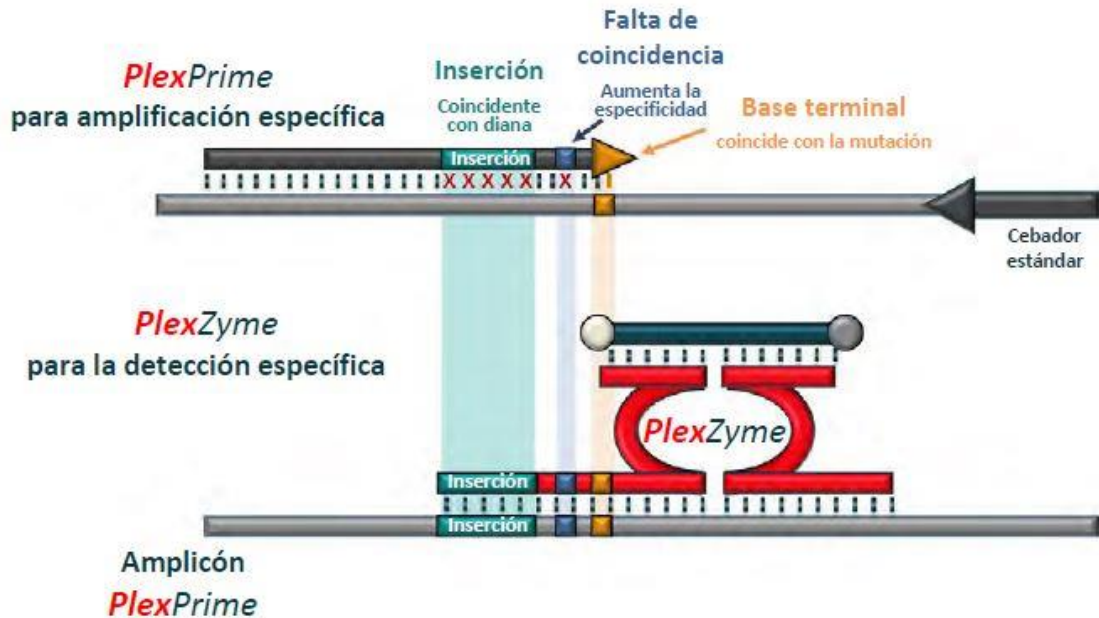


Figura 16: Representación esquemática del cebador PlexPrime® junto con detección PlexZyme®. El cebador PlexPrime® amplifica específicamente la secuencia de mutaciones, y los enzimas PlexZyme® detectan específicamente el amplicón. Imagen extraída del insert de la técnica.

La combinación única de cebadores PlexPrime® junto a enzimas PlexZyme® permite la amplificación específica de secuencias de mutaciones y la detección sensible y específica en el ensayo multiplex.

La extracción del DNA a estudio se puede llevar a cabo por las plataformas MagNAPure 96 o MICROLAB STARlet IVD, requiriendo un volumen de muestra mínimo de 200 o 300 µL, respectivamente. Posteriormente, el proceso de amplificación se ha validado para diferentes equipos (Light Cycler 480, 7500 Fast o CFX 96).

Los resultados obtenidos son procesados mediante el software Ugentec FastFinder, el cual es proporcionado por el fabricante, que te facilita un listado de los resultados interpretados para cada muestra y mediante el cual puedes analizar las curvas de amplificación obtenidas en cada caso.

Esta tecnología de SpeedX fue adaptada posteriormente a la plataforma GeneXpert® (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA), un sistema rápido point-of-care que integra la extracción de material genético, amplificación en tiempo real y análisis de los resultados, en un formato de cartuchos individuales. El equipamiento consiste en un instrumento asociado a un ordenador que posee un software programación de pruebas e interpretación de resultados. Este sistema está ampliamente desarrollado para otros patógenos, tanto bacterias (*S. agalactiae*, *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae*...), virus (detección de VIH, VHB, VHC, *Enterovirus*...), micobacterias (*M. tuberculosis* y genes de resistencia a principales antituberculosos) o detección de genes de resistencia bacterianos (carbapenemasas, *S. aureus* meticilin-resistente...).

Este kit es capaz de detectar la presencia de *M. genitalium* y cuatro de las mutaciones más frecuentes asociadas a resistencia a macrólidos en solo 2 horas, y dado que el procesamiento requerido es mínimo, es una opción más que valorable para su uso en las clínicas de atención a la salud sexual a pie de paciente, permitiendo que el paciente salga de la consulta con una pauta antibiótica que, *a priori*, será adecuada para resolver su infección.

2. Justificación y objetivos

2.1. Justificación de la unidad temática de la tesis

El análisis de los microorganismos que producen patología en el ser humano, así como las infecciones que producen, su diagnóstico y su tratamiento es un tema en continuo estudio y evolución a lo largo del tiempo. La microbiología clínica tiene, en este contexto, un papel fundamental, dado que el empleo de las herramientas adecuadas para conseguir un diagnóstico condicionará la evolución clínica de nuestros pacientes.

El diagnóstico microbiológico puede ser de dos tipos: indirecto o directo, El diagnóstico indirecto se emplea en aquellos casos en los que, por algún motivo, no se puede disponer de la cepa causante de la infección. Un ejemplo de este tipo de técnicas es la serología, basada en la detección de la respuesta inmune generada por un individuo al ser infectado por un microorganismo concreto. En muchos otros casos, el diagnóstico se aborda de forma directa mediante el aislamiento del patógeno en medios de cultivo. De forma complementaria, las técnicas moleculares permiten detectar el material genético del microorganismo de interés, sin requerir de la bacteria completa ni viable.

. Este tipo de métodos han revolucionado el campo del diagnóstico microbiológico desde su aparición, dado que aportan una sensibilidad y especificidad muy superiores al cultivo tradicional.

El principal inconveniente de las técnicas moleculares es que, a pesar de tener un diagnóstico, no se pueden realizar estudios de sensibilidad antibiótica al no disponer de la cepa bacteriana. Sin embargo, una alternativa es el estudio molecular del genoma en busca de genes o mutaciones conocidas que han sido asociadas con resistencia antibiótica a diferentes antibióticos.

Las bacterias del género *Mycoplasma* forman parte de ese grupo de patógenos cuyo aislamiento en cultivo es altamente complejo. Dentro del género, dos de las especies más relevantes en patología humana son *M. pneumoniae* y *M. genitalium*.

M. pneumoniae provoca diferentes entidades clínicas, siendo la neumonía la de mayor interés. Se estima que, a niveles endémicos, causa de un 4-8% de neumonías adquiridas en la comunidad, elevándose este valor hasta un 20-40% en los picos epidémicos en la población general. Afecta mayoritariamente a niños y adolescentes.

En el Servicio de Microbiología del Hospital Germans Trias i Pujol, la serología es la técnica empleada para el diagnóstico rutinario de los cuadros respiratorios con sospecha de *M. pneumoniae*.

En el año 2012 se concedió a nuestro servicio, en colaboración con el Servicio de Pediatría, un proyecto de investigación financiado por el Instituto de Salud Carlos III titulado “Nuevas aproximaciones moleculares al estudio epidemiológico, patogénico y diagnóstico de las infecciones respiratorias causadas por *Mycoplasma pneumoniae*” (P112/02298), el que tuve la oportunidad de participar. Este proyecto se desarrolló en forma de estudio prospectivo transversal de cuatro años de duración, cuyo objetivo era profundizar en el conocimiento de la epidemiología, patogenia y diagnóstico de las infecciones respiratorias adquiridas en la comunidad causadas por *M. pneumoniae* en niños y adultos en nuestro área sanitaria.

En este contexto, se comenzó a realizar la determinación de *M. pneumoniae* en muestras respiratorias por técnicas moleculares, realizando en paralelo la detección de anticuerpos en suero, al tratarse de nuestro gold standard.

En aquellas muestras en las que se detectaba genoma de *M. pneumoniae*, el siguiente paso era realizar el tipado molecular mediante MLVA, así como analizar la presencia de mutaciones genéticas asociadas a resistencia a antibióticos por pirosecuenciación (equipo que teníamos disponible en el laboratorio). Ambas técnicas se pusieron a punto para llevar a cabo este estudio. Los resultados de dicho estudio se publicaron y conforman el **Artículo I** en el que se basa esta tesis.

Por otro lado, *M. genitalium* ha pasado a ser un tema de gran interés y preocupación en la última década. Se trata de un patógeno de transmisión sexual causante de cuadros de uretritis no producida por gonococo ni por clamidia, al que se le pueden atribuir de un 10-35% casos en grupos de riesgo como los hombres que tienen sexo con hombres o los pacientes que acuden a clínicas de salud sexual.

Además del problema de salud y epidemiológico, *M. genitalium* tiene una elevadísima capacidad para adquirir resistencias a los antimicrobianos, por lo que tiene gran potencial de convertirse en una superbacteria intratable en un futuro más bien cercano.

Su diagnóstico se basa casi exclusivamente en técnicas moleculares. Dado el interés sanitario y epidemiológico de este tema, la poca información disponible sobre este microorganismo en nuestro país y nuestra experiencia previa con *M. pneumoniae*, decidimos diseñar un proyecto para el análisis de las resistencias a macrólidos en *M.*

genitalium, adaptando la técnica que habíamos desarrollado previamente para *M. pneumoniae*. Este estudio se presentó como proyecto de investigación de una beca Germans Trias Talents de un año de duración, otorgada por nuestra institución a jóvenes investigadores, y que me fue concedida. Se trató de un estudio prospectivo de un año de duración, realizado en colaboración con la Unidad de VIH y el Servicio de Ginecología y Obstetricia de nuestro centro, y los servicios de Atención a la Salud Sexual y Reproductiva (ASSIR) de Badalona y Mataró.

Durante el desarrollo del estudio, se comenzaron a comercializar métodos moleculares que incluían la detección de *M. genitalium* y las principales mutaciones asociadas a resistencia a macrólidos de forma simultánea. Con el objetivo de evaluar esta nueva tecnología, y poder compararla con nuestra técnica casera, realicé una estancia en el Centro Nacional de Referencia de ITS de Francia, ubicado en la ciudad de Burdeos. Durante esta estancia, además de analizar las muestras en búsqueda de mutaciones asociadas a resistencia a macrólidos por la tecnología comercial, realizamos de forma complementaria un análisis de mutaciones asociadas a resistencia a fluoroquinolonas, tratamiento de segunda línea para esta patología. Dichos resultados, publicados recientemente, conforman el **Artículo II** de la presente tesis doctoral.

Tanto *M. pneumoniae* como *M. genitalium* son patógenos con gran relevancia clínica e interés, dado que su biología celular y su alta capacidad de adquisición de resistencias hacen que las opciones terapéuticas contra ellos sean cada vez más limitadas. Además, el cultivo convencional no es una opción diagnóstica en estos casos y la serología, en el caso de *M. pneumoniae*, no es inmediata, sino que existe un periodo ventana hasta la producción de anticuerpos que hace que a los pacientes se les deba administrar un tratamiento empírico que en algunas ocasiones no será el adecuado. Por otro lado, el porcentaje creciente de cepas de *M. genitalium* resistentes a macrólidos en otros países ha hecho que el manejo terapéutico de las ITS cambie de modelo, con el fin de evitar el encontrarnos con enfermedades de transmisión sexual “intratables”.

Por todo ello, el conocimiento e implantación de técnicas moleculares que contribuyan al diagnóstico, tratamiento y epidemiología de las infecciones causadas por ambas bacterias constituye un tema de interés que permitirá optimizar el tratamiento y manejo de nuestros pacientes, y, en definitiva, mejorar la calidad de la atención prestada en las instalaciones sanitarias.

2.2. Objetivos

1. Evaluación de la utilidad de las técnicas moleculares en el estudio de *Mycoplasma pneumoniae*:
 - 1.1. Evaluación de una PCR múltiple de diagnóstico de neumonía atípica bacteriana (Anyplex® 2 RB5 Detection, Seegene Inc., Korea) mediante comparación con la técnica serológica de aglutinación de partículas de gelatina (Serodia®-MYCO II, Fujirebio Europe), como nuestra técnica gold standard en el diagnóstico de las infecciones causadas por *M. pneumoniae*.
 - 1.2. Optimización y estudio de la aplicabilidad de las técnicas de genotipado mediante MLVA (*múltiple locus variable-number tandem-repeat analysis*) en el estudio de la epidemiología de las infecciones por *M. pneumoniae* en nuestro territorio.
 - 1.3. Optimización de la técnica de pirosecuenciación para el análisis de la resistencia a macrólidos en *M. pneumoniae* en nuestro medio.
2. Aplicación de técnicas moleculares al estudio de *Mycoplasma genitalium*:
 - 2.1. Detección de mutaciones genéticas asociadas a la resistencia a macrólidos en *M. genitalium* mediante la adaptación de las técnicas previamente desarrolladas para *M. pneumoniae*.
 - 2.2. Comparación de los resultados obtenidos para la detección de resistencia a macrólidos en *M. genitalium* por pirosecuenciación (técnica casera en dos pasos) con la nueva técnica molecular en un solo paso ResistancePlus® MG kit (SpeeDx, Sydney, NSW, Australia).
 - 2.3. Evaluación de la situación epidemiológica en nuestra zona, al no existir ningún tipo de datos disponibles en la actualidad.

3. Resumen y discusión global de los resultados obtenidos

ARTÍCULO 1. Macrolide resistance and molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* infections during a 4 year period in Spain

Belén Rivaya, Elena Jordana-Lluch, Gema Fernández-Rivas, Sònia Molinos, Roi Campos, María Méndez-Hernández y Lurdes Matas

Mycoplasma pneumoniae es un patógeno respiratorio causante del 20-40% de neumonías adquiridas en la comunidad (NAC) en niños y adultos jóvenes. Los casos aparecen en forma de picos epidémicos a nivel mundial cada 3-7 años (40).

La dificultad de cultivo de este patógeno ha hecho que el diagnóstico de estas infecciones se realice habitualmente por serología, considerada la técnica gold standard, pero la aparición de diversas técnicas moleculares se presenta como una alternativa rápida y con elevada sensibilidad y especificidad para la detección de esta bacteria. Además, la existencia de paneles sindrómicos, que permiten el diagnóstico de varios patógenos causantes de una entidad concreta de forma simultánea, ha supuesto un gran avance en los laboratorios de microbiología.

Las técnicas moleculares no se emplean únicamente para el diagnóstico, sino que su campo de aplicación es mucho más amplio. A nivel epidemiológico, nos permiten caracterizar las cepas circulantes en un área concreta o la investigación de brotes. Entre ellas, el MLVA es uno de los métodos más empleados por su elevado poder discriminatorio (124).

El tratamiento de elección en las neumonías causadas por *M. pneumoniae* es la azitromicina, escogida entre los macrólidos por su favorable perfil farmacocinético y escasos efectos secundarios. Como tratamientos alternativos están las tetraciclinas y las quinolonas, pero sus efectos adversos en la edad infantil hacen que solo se empleen en casos excepcionales. El problema surge con la aparición de mutaciones en el genoma de la bacteria, fundamentalmente en el dominio V del 23S rRNA, que producen resistencia a este grupo de antibióticos.

Esta resistencia puede ser de elevado nivel, como es el caso de las mutaciones en las posiciones 2063 y 2064 (numeración de *M. pneumoniae*) o de bajo nivel (mutaciones en las posiciones 2067 o 2617). Otras regiones en las que potencialmente se podrían detectar

mutaciones implicadas en la resistencia a macrólidos son el dominio II del 23S rRNA (de momento no se han descrito) o en las proteínas ribosomales L4 o L22. En estas últimas se han encontrado mutaciones tanto *in vitro* (154) como *in vivo* (155), pero el impacto real de su presencia no está del todo claro.

Dado que el cultivo de *M. pneumoniae* queda relegado a centros de referencia por su complejidad, tampoco se pueden realizar estudios de sensibilidad convencionales en los laboratorios de diagnóstico clínico. Por este motivo, se han desarrollado diversas metodologías para el estudio de la región del gen 23S rRNA en la que se suelen encontrar las mutaciones, como son la PCR seguida de análisis de curvas de melting (157, 158, 183), secuenciación tipo Sanger (184), pirosecuenciación (185-187) o RFLP (156).

El amplio uso de la azitromicina ha hecho que en los últimos años las tasas de resistencia a macrólidos en *M. pneumoniae* hayan incrementado de manera preocupante. Por ejemplo, en China se ha pasado de un 40% de resistencias en el año 2008 a unas tasas cercanas al 100% en determinadas regiones. En Europa, la proporción de resistencias es variable, oscilando desde un 0.2% en Suecia (133) o un 1% en Eslovenia (134), hasta un 19% en Escocia (137) o un 25.6% en Italia (138).

Este hecho hace necesaria la detección rápida de las cepas resistentes para optimizar el tratamiento de los pacientes.

Por este motivo, y dada la carencia de datos sobre *M. pneumoniae* en nuestro país, los objetivos de este estudio fueron:

1. Evaluar una técnica de PCR en tiempo real para el diagnóstico de *M. pneumoniae*, en comparación con la serología, como nuestro método gold standard.
2. Realizar un análisis epidemiológico de los genotipos circulantes de *M. pneumoniae* en nuestra área y su distribución a lo largo del tiempo.
3. Evaluar el porcentaje de cepas de *M. pneumoniae* resistentes a macrólidos en nuestra zona de influencia mediante el estudio de mutaciones en el dominio V del gen del 23S rRNA por pirosecuenciación.

Diseño del estudio

Entre los años 2013 y 2016 se llevó a cabo un estudio prospectivo para la detección de *M. pneumoniae* en niños (fundamentalmente) y adultos ingresados que presentaban clínica compatible con neumonía atípica. Adicionalmente, se realizaron pruebas

moleculares tanto a familiares de los pacientes diagnosticados como a algunos voluntarios sanos.

En primer lugar, se llevó a cabo la comparación de la técnica de PCR en tiempo real con la serología, técnica empleada en la rutina asistencial del laboratorio.

Las muestras de aspirado nasofaríngeo fueron procesadas para extraer su DNA mediante la plataforma nucliSENS® easyMag® platform (bioMérieux, Francia).

Se evaluaron dos técnicas de PCR en tiempo real: en la primera etapa del proyecto se empleó el reactivo Real Time PCR Realcycler *M. pneumoniae/Chlamydomphila pneumoniae* (Progenie molecular, España), una técnica de PCR múltiple que permitía detectar ambos patógenos a la vez. Posteriormente, y de forma más extensa, se comenzó a utilizar el reactivo Anyplex™ II RB5 Detection (Seegene Inc., Korea). Este último es un kit de PCR multiplex basado en curvas de melting, que permite la detección simultánea de cinco patógenos asociados a neumonía atípica (*M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *B. pertussis* y *B. parapertussis*).

En paralelo, se realizó el diagnóstico serológico de rutina en el laboratorio, utilizando un ensayo de aglutinación de partículas de gelatina (Serodia®-MYCO II, Fujirebio Europe), capaz de detectar anticuerpos totales (IgG+IgM) frente a *M. pneumoniae*.

Posteriormente, en aquellas muestras respiratorias en las que se detectó *M. pneumoniae* por PCR, se procedió a su genotipado y detección de resistencia a macrólidos por mediante MLVA y pirosecuenciación, respectivamente.

Resultados y discusión

Nuestro estudio se trata del primero en nuestra región que abarca el estudio completo de *M. pneumoniae*, incluyendo su detección, genotipado y prevalencia de resistencia a macrólidos.

Se procesaron 821 muestras de aspirado nasofaríngeo de 774 pacientes, correspondiendo a niños en 769 casos (766 de ellos con sospecha de neumonía o familiares de un paciente con cuadro neumónico y 3 niños sanos) y a adultos en 52 casos (29 de ellos con cuadro de neumonía o familiares cercanos, y 23 voluntarios sanos). La explicación detallada de las muestras incluidas en el estudio está disponible en la Tabla 1 del artículo.

Por métodos moleculares, se detectó *M. pneumoniae* en 138 muestras (16.8%) de 127 pacientes. En una de las muestras no se pudo realizar estudios de genotipado y detección de resistencias por tener escasa cantidad de DNA, lo que arroja un total de 137 muestras positivas, tres de ellas detectadas por Progenie y 134 por Anyplex. Esta proporción de positivos es similar a las descritas en otros países europeos, dado que las infecciones por este microorganismo se producen como olas de casos con una periodicidad de entre 3 y 7 años (135, 188).

El 97.1% de positivos (N=133) se encontraron en niños, correspondiendo el 2.9% (N=4) restante a familiares adultos de niños infectados. La edad media de los niños fue 6.6 años y la mayor parte de los positivos se encontró en el grupo de niños mayores de 5 años (53.3%, 73/137), seguido de niños entre 1-5 años (36.4%, 50/137) y menores de un año (7.3%, 10/137). Estos hallazgos son comparables con los descritos en la literatura (134).

La mayor parte de las muestras fue recogida en los años centrales del proyecto, lo que explica que el porcentaje de positivos sea mayor en ese periodo de tiempo. La ratio de positividad fue del 26% en 2013 (19/73), 19% en 2014 (49/258), 13.2% en 2015 (56/423) y 22.4% en 2016 (15/67).

La serología es la técnica más comúnmente empleada por los laboratorios clínicos en el diagnóstico de *M. pneumoniae*. Para obtener un mayor rendimiento, se recomienda la recogida de dos muestras de suero, una en la fase aguda de la enfermedad y otra en la fase de convalecencia (2-3 semanas después), que serán procesadas en paralelo con objetivo de demostrar seroconversión. La seroconversión se define como el aumento de cuatro veces el título de anticuerpos, lo que en esta técnica, dado que se emplean diluciones dobles progresivas en su ejecución, supone un aumento de dos diluciones respecto al título de la primera muestra.

En la población infantil, la aparición rápida de IgM hace que en hasta un 50% de los casos el diagnóstico pueda realizarse con una única muestra de la fase aguda (109, 189).

El punto de corte para la positividad de la serología establecido en nuestro centro (tras años de experiencia y con el que se obtiene una mayor sensibilidad) es un título de 1/160. Todas aquellas determinaciones $\geq 1/160$ se consideran positivas para *M. pneumoniae*, mientras que valores inferiores se consideran negativos.

El diagnóstico serológico se realizó de forma paralela a la PCR en 376 casos, incluyendo 105 pacientes con PCR positiva y 271 con PCR negativa. Entre los 105 casos positivos, la serología en fase aguda (primera muestra) fue también positiva en 75 casos (71.4%), mientras que, entre los 30 casos negativos restantes, se pudo observar una seroconversión en 13 de ellos (43.3%) en la muestra de fase de convalecencia (segunda muestra). El total de pacientes con serología y PCR positivas fue de 88/105 (83.8%), lo que supone una concordancia de un 76% entre ambas técnicas (si solo considerásemos los casos con serología positiva en fase aguda, la concordancia sería de un 73%). Información detallada disponible en la Tabla 3 del artículo.

Entre los 271 pacientes con PCR negativa, la serología también fue negativa en 199 casos (73.4%), mientras que mostró un resultado positivo en 72 casos, por lo que, si comparamos ambas técnicas, la sensibilidad de la PCR comparada con la serología fue de 55% y la especificidad de un 72%.

Las discrepancias entre ambos métodos son inherentes a la naturaleza de las técnicas (190-192). En el caso de la PCR, se trata de una técnica de diagnóstico directo en la que nuestra diana es el DNA de la bacteria de interés. Una prueba de PCR positiva no implica necesariamente ni que el microorganismo sea viable (podría tratarse de material genético de bacterias no viables por tratamiento antibiótico previo), ni que esté produciendo una infección activa en ese momento, ya que se ha demostrado que *M. pneumoniae* puede persistir colonizando la nasofaringe durante periodos prolongados de tiempo sin ningún tipo de manifestación clínica.

De hecho, Nilsson et al. realizaron un estudio en el que comparaban PCR con serología y en el que encontraron DNA de *M. pneumoniae* hasta 7 semanas después de la resolución del cuadro clínico a pesar de haber sido tratado con un antibiótico adecuado (190). En la misma línea, Meyer Sateur et al. detectaron DNA de *M. pneumoniae* hasta en un 48% de niños sanos que habían escogido como controles para su estudio (193).

Por otro lado, la serología es un método de diagnóstico indirecto, es decir, busca la respuesta inmune humoral del individuo frente a una infección. Esto implica que el sistema inmune requiere un tiempo desde que se inicia el cuadro clínico hasta que los niveles de anticuerpos en suero son detectables (periodo ventana). La recogida de suero en el inicio de la infección puede dar lugar a resultados falsos negativos, así como puede ocurrir en pacientes inmunodeprimidos, cuya capacidad de síntesis de anticuerpos puede estar mermada (194). Además, la IgM puede detectarse meses o

incluso años tras la infección por *M. pneumoniae* (191, 192). Kim et al. sugirieron el aumento del cut-off en la serología de *M. pneumoniae* a 1/640 para el diagnóstico de la neumonía en fase aguda, para intentar evitar de esta forma los falsos positivos por infecciones previas (194). En nuestro estudio, entre aquellos casos con serología positiva y PCR negativa, una gran parte de los pacientes poseían títulos de 1/160 o 1/320 en fase aguda, título que no sufría cambios en la fase de convalecencia (en caso de haber muestra disponible), lo que concuerda y apoya lo indicado por Kim et al.

Se requieren más estudios para aclarar el impacto de los portadores en la transmisión de la enfermedad en la comunidad. Las técnicas moleculares aportan una gran sensibilidad diagnóstica pero no son capaces por sí solas de distinguir entre infección activa y colonización, por lo que la combinación de ambas metodologías parece la opción más adecuada (44).

El MLVA es una técnica de genotipado con gran potencia para la discriminación entre cepas (195). En nuestro estudio, se detectaron 11 tipos de MLVA, siendo los más abundantes el 4-5-7-2 (70/137, 50.1%), el 3-5-6-2 (40/137, 29.2%) y el 3-6-6-2 (11/137, 8%). Tanto 4-5-7-2 como 3-5-6-2 fueron también los perfiles más encontrados en otros países de Europa (133, 196, 197), Estados Unidos (66) y China (198, 199).

La proporción de los distintos genotipos fue variando a lo largo del estudio, encontrando estos resultados en la Figura 1 del artículo.

Durante los años con mayor número de casos (2014 y 2015), el genotipo 4-5-7-2 se detectó en proporciones similares, mientras que se observó un aumento del genotipo 3-5-6-2 ligado a un descenso de genotipo 3-6-6-2 en ese periodo. Además, su distribución fue estacional, siendo el genotipo 4-5-7-2 más frecuente en verano mientras que el 3-5-6-2 se detectó predominantemente en invierno y primavera. El genotipo 3-6-6-2 se encontró mayoritariamente en la primavera de 2014, mientras que los genotipos restantes fueron detectados a lo largo de todo el estudio.

La transmisión domiciliaria de *M. pneumoniae* queda reflejada al encontrar 4 muestras de adultos con el mismo perfil de los niños infectados convivientes, sugiriendo que el origen de la transmisión era en el propio domicilio.

Durante el periodo de estudio también se registraron diversas reinfecciones (12/137) tras 1-2 meses desde la primera muestra. En 9 casos, el perfil MLVA fue el mismo que el de la muestra inicial, pero en dos pacientes se observó un cambio en este perfil que

afectaba a una de las regiones (de 3-6-6-2 a 3-5-6-2 y de 3-5-6-2 a 3-5-7-2). En estos casos, el segundo aislamiento podría tratarse de una variante del primero.

Otra de las preguntas era si los diferentes genotipos podían estar relacionados con una mayor severidad de los síntomas. En nuestro estudio, no se encontró ningún tipo de correlación entre la sintomatología y el genotipo detectado (información adicional en la Tabla 2 del artículo), a diferencia de lo descrito por Yan et al. (200), en el que el MLVA estaba relacionado con la evolución clínica, y que determinados genotipos tenían un mayor riesgo de progresión a neumonía grave.

Adicionalmente, se realizó un análisis de los virus respiratorios presentes en los pacientes con una neumonía por *M. pneumoniae* confirmada. En la mayoría de los casos, se detectaron múltiples coinfecciones virales, lo que implica que la sintomatología del cuadro podría deberse bien a *M. pneumoniae* o a alguno de los virus detectados. El *Rhinovirus* fue el virus más detectado (37.9%, N=30), pero algunos estudios describen su detección en niños asintomáticos (201), por lo que estos resultados deben interpretarse con precaución. Además del anterior, el *Parainfluenza* (15.2%, N=12) y el virus respiratorio sincitial (13.9%, N=11) pueden causar una sintomatología compartida con *M. pneumoniae*, por lo que es importante tenerlos en cuenta. Los genotipos más coinfectados con virus fueron el 4-5-7-2 y el 3-5-6-2 ($p=0.033$). Estos resultados se encuentran detallados en la Tabla 4 del artículo.

Finalmente, se realizó el análisis de mutaciones asociadas a resistencia a macrólidos en las muestras positivas para *M. pneumoniae*, detectándose en un 8% de los casos (11 muestras de 10 pacientes). Las mutaciones encontradas fueron de cuatro tipos, tres de ellas en la región 1 y una en la región 2 (numeración *M. pneumoniae*): A2063G (N=7), A2063T (N=1), A2064G (N= 2) (región 1) and C2617A (N=1) (región 2).

Los macrólidos son el tratamiento de elección en las neumonías causadas por *M. pneumoniae* en nuestro país (132, 202). Las quinolonas y las tetraciclinas generalmente se evitan en niños por sus efectos adversos (203), aunque países como Japón, con un elevado nivel de resistencia a macrólidos, han incluido el tosufloxacino o minociclina en pacientes con neumonía por *M. pneumoniae* que no responde a macrólidos (140).

Se han publicado múltiples estudios en torno a la resistencia a macrólidos en *M. pneumoniae*. Hasta aproximadamente el año 2000, los casos de cepas resistentes a macrólidos eran anecdóticos. A partir de esa fecha, aparecieron las primeras cepas resistentes en Asia ligadas al uso desmesurado de macrólidos (204), y las tasas de

resistencia en ese continente oscilan entre el 13 y el 100% en países como China (205-209) o Japón (156, 210-212). En Europa, el elevado porcentaje de cepas resistentes descrito en Italia (25.6%) parece originado igualmente por presión antibiótica (138). En el resto del continente, los porcentajes son variables, oscilando entre tasas del 0.2 al 1.2% en Suecia, Eslovenia o Alemania, respectivamente (133, 134, 213), del 9.3% en Inglaterra (136), 9.8% en Francia (157) y hasta casi 20% en Escocia (137). Suecia era hasta recientemente uno de los pocos países en los que no se habían detectado cepas resistentes a macrólidos por el uso restringido que hacen de los mismos (214).

En nuestro estudio, entre las cepas portadoras de una mutación asociada con resistencia a macrólidos, el genotipo de MLVA más frecuente fue el 4-5-7-2 (N=8), seguido del 3-5-6-2 (N=3). Todas las cepas resistentes estaban ligadas a un tratamiento previo con macrólidos, incluyendo 6 casos en los que la resistencia se generó durante el tratamiento con macrólidos del propio episodio estudiado. En estos casos, se demostró que se trataba de una resistencia de novo y no de una reinfección con un genotipo resistente gracias al genotipado por MLVA, cuyo perfil fue el mismo en la muestra tomada previo inicio del tratamiento y en el periodo de convalecencia. Es más, en uno de los pacientes, la resistencia se generó tras administrarse únicamente dos dosis de azitromicina, ya que el tratamiento fue suspendido debido a una intolerancia del mismo.

En otros cuatro casos, la primera muestra de los pacientes ya presentaba una mutación asociada a resistencia, pero en la historia clínica constaba un tratamiento con macrólidos en los últimos 6 meses. El último caso correspondió con un paciente cuyo hermano presentó un cuadro de NAC no filiado que fue tratado con macrólidos.

En todos los casos, y a pesar del patrón de resistencia detectado, la sintomatología clínica se resolvió sin ninguna incidencia sin cambiar el tratamiento con macrólidos pautado inicialmente.

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones. En primer lugar, las muestras de suero y aspirado nasofaríngeo se recogieron de forma simultánea en aquellos pacientes con sospecha de neumonía atípica causada por *M. pneumoniae*. Esto implica que en aquellos cuadros de NAC donde se sospechaba de otra etiología (por ejemplo, vírica), no tuvimos muestra de suero para realizar la serología de *M. pneumoniae*, lo que habría mejorado la comparación entre ambas técnicas diagnósticas. En segundo lugar, a pesar de que el número total de muestras estudiado fue elevado (N=821), el porcentaje de positivos para *M. pneumoniae* fue relativamente bajo (N=137) para la realización de cálculos estadísticos. En tercer lugar, para el análisis de resistencias únicamente se realizó el estudio de las

mutaciones presentes en el dominio V del 23S rRNA, y no de las posibles mutaciones en las proteínas ribosomales L4 y L22. Finalmente, este análisis aborda una región limitada de nuestro país, por lo que sería interesante la realización de un estudio multicéntrico a nivel nacional en un periodo de tiempo más largo que analizase los picos de infección y corroborase si los genotipos circulantes son los mismos que los detectados en nuestro estudio.

En conclusión, este artículo describe por primera vez los genotipos de *M. pneumoniae* circulantes en nuestra zona, junto a su patrón de resistencia a macrólidos. Los genotipos más abundantes fueron el 4-5-7-2 y el 3-5-6-2, y la resistencia a macrólidos fue de un 8%. Dado que los cuadros neumónicos causados por *M. pneumoniae* suelen evolucionar de forma favorable incluso en ausencia de tratamiento antibiótico y el amplio uso de este tipo de antimicrobianos en la población infantil, cabe plantearse si el tratamiento es necesario en todos los casos, teniendo en cuenta la facilidad de generación de resistencia a macrólidos observado en el estudio realizado.

ARTÍCULO 2. Detection and Prevalence of Macrolide and Fluoroquinolone Resistance in *Mycoplasma genitalium* in Badalona, Spain

Belén Rivaya, Chloé Le Roy, Elena Jordana-Lluch, Gema Fernández-Rivas, Cristina Casañ, Victoria González, Jun Hao Wang-Wang, Cécile Bébéar, Lurdes Matas and Sabine Pereyre

Mycoplasma genitalium es un patógeno de transmisión sexual causante de entre un 15-20% de uretritis no gonocócica en hombres (79) y cervicitis, enfermedad inflamatoria pélvica, parto pretérmino o aborto en mujeres (99).

Conseguir su crecimiento en cultivo es extremadamente complejo, por lo que los métodos moleculares son de elección para realizar el diagnóstico (215). Tal como ocurre con *M. pneumoniae*, los macrólidos son el tratamiento de primera línea. La elevada capacidad de esta bacteria para adquirir resistencias a los mismos plantea la posibilidad de que se transforme en una ITS intratable en un futuro cercano, por lo que en la actualidad se recomienda una pauta extendida de macrólidos en lugar de la monodosis de 1g para intentar evitar esta situación. Moxifloxacino supone la segunda línea de tratamiento en cepas resistentes a ML (92), pero la aparición de cepas con resistencia dual a ambas categorías (216, 217) ha hecho que la doxiciclina (con baja eficacia para la erradicación de la bacteria) o la pristinamicina deban considerarse como tratamientos alternativos (92).

Dado que *M. genitalium* se puede detectar en gran número de pacientes que no muestran sintomatología alguna, las pruebas diagnósticas están indicadas exclusivamente en pacientes sintomáticos, con objeto de minimizar los efectos de la presión antibiótica al administrar tratamientos innecesarios. En aquellos pacientes que sí presentan sintomatología, la recomendación es la de realizar en los casos positivos el análisis de resistencia a macrólidos, para ajustar la antibioterapia y resolver así las infecciones (92).

Tal como ocurre en *M. pneumoniae*, las mutaciones asociadas a resistencia a ML se encuentran en el dominio V del 23S rRNA, fundamentalmente en las posiciones 2058, 2059 y 2062 (numeración de *E. coli*). Tradicionalmente, los estudios de resistencia se han llevado a cabo por métodos caseros (218, 219), pero la situación de riesgo actual ha fomentado la aparición de kits comerciales que permiten la detección del microorganismo y su patrón de resistencia a macrólidos de forma simultánea (178). De forma similar, la resistencia a quinolonas está causada principalmente por mutaciones en los genes *parC* o *gyrA* (167), y su detección tiene especial interés en aquellos pacientes con una cepa resistente a ML o que presenten fracaso terapéutico tras tratamiento con moxifloxacino, para restringir los tratamientos de tercera línea al menor número de pacientes posible. El estudio de resistencia a quinolonas se puede realizar también por técnicas caseras (164) o

recientemente con la aparición de kits comerciales únicamente autorizados con fines de investigación (171, 172).

Los objetivos de nuestro estudio fueron:

1. Evaluar la utilidad de la pirosecuenciación como técnica casera de dos pasos para la detección de resistencia a macrólidos en *M. genitalium*
2. Comparar la pirosecuenciación, como técnica casera en dos pasos, con un reactivo comercial en un solo paso
3. Estudiar la prevalencia de cepas resistentes a macrólidos y/o quinolonas en nuestra área de influencia, dada la escasa información disponible sobre el tema en nuestro país.

Diseño del estudio

El estudio realizado consta de dos partes diferenciadas: una retrospectiva, en la que se analizaron 234 muestras de *M. genitalium* positivas procesadas en el servicio de Microbiología en los años 2016-2017 y una parte prospectiva de un año de duración (diciembre de 2017 a noviembre de 2018) que incluyó 181 muestras con detección de *M. genitalium* provenientes de los centros de Atención a la Salud Sexual y Reproductiva (ASSIR) de Badalona y Mataró y de las unidades de VIH y ginecología y obstetricia del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Las 415 muestras totales provenían de pacientes a los que se les había solicitado un estudio de ITS, independientemente de que se tratasen de pacientes asintomáticos, sintomáticos o contactos de estos últimos. Información detallada en Tabla 1 del artículo.

El diagnóstico de *M. genitalium* se realizó mediante el ensayo de PCR en tiempo real Allplex STI-7 Assay (Seegene Inc., Seoul, Korea), tras extracción previa del DNA con las plataformas Microlab NIMBUS (Hamilton Company, Reno, NV, EEUU) o STARlet IVD (Seegene Inc., Seoul, Korea).

En aquellas muestras positivas, se estudió la presencia de mutaciones asociadas a resistencia a ML mediante pirosecuenciación, adaptando el procedimiento de Spuesens et al. que habíamos utilizado previamente para la detección de resistencias en *M. pneumoniae* (185) con los primers empleados por Jensen et al. (218).

Para evaluar la pirosecuenciación como un método adecuado para la detección de resistencia a ML en *M. genitalium*, se procesó un subgrupo de 100 muestras mediante el kit comercial ResistancePlus® MG kit (SpeeDx, Sydney, NSW, Australia). Este kit ofrece la

detección simultánea de *M. genitalium* junto a las 5 principales mutaciones asociadas a resistencia a ML. Adicionalmente, se analizó la existencia de mutaciones relacionadas con la resistencia a quinolonas mediante secuenciación del gen *parC*. Ambos procesos se llevaron a cabo en la Universidad de Burdeos, Francia.

Resultados y discusión

Un total de 415 muestras de 407 pacientes que requirieron diagnóstico de ITS fueron positivas para *M. genitalium* mediante Allplex STI-7 assay en el periodo de estudio. La mayor parte de las muestras (N=371) provenía de pacientes jóvenes reclutados en los ASSIR por el programa de vigilancia para monitorizar las infecciones por *C. trachomatis* en los menores de 25 años llevado a cabo en Cataluña desde 2007 (220). Esto implica que el mayor volumen de muestras para estudio de ITS recibidas en el laboratorio pertenezca a pacientes de este grupo de edad.

Entre los pacientes había un 75.9% de mujeres (N=309) y un 24.1% de hombres (N=98). La media de edad fue de 26.2 años (rango de 16 a 68). La mayor proporción de positivos fue detectada en los individuos hasta 25 años (N=199, 47.95%), seguido del grupo de 26 a 40 años (N=158, 38.07%) y mayores de 40 años (N=58, 13.98%).

Se realizó un registro de datos epidemiológicos, sintomatología y razón para solicitar un estudio de ITS en 136/181 pacientes pertenecientes al estudio prospectivo, mostrando que la mayor parte de los pacientes referían que, pese a estar asintomáticos, o eran contactos de un paciente con una ITS o habían mantenido relaciones sexuales sin protección (N=70, 52%). Entre los pacientes sintomáticos, las manifestaciones clínicas más frecuentes fueron la uretritis (N=12, 9%) y la leucorrea (N=11, 8%). Información complementaria acerca de la sintomatología y datos epidemiológicos disponibles en la Figura 1 y la Tabla 2 del artículo.

Respecto a los factores de riesgo para padecer una infección por *M. genitalium*, nuestra cohorte incluyó 38 pacientes infectados por VIH, de los cuales 36 (94.7%) eran HSH. La mayoría estaban asintomáticos (63.2%, N=24), pero entre los que referían clínica, la proctitis (15.8%, N=6), la uretritis (13.2%, N=5) o la disuria (7.9%, N=3) fueron los síntomas más prevalentes. La positividad en muestras rectales fue superior en pacientes asintomáticos que en los sintomáticos, tal como ocurrió en el estudio de Read et al. (91). Cabe destacar que, en esta cohorte, *M. genitalium* fue el único patógeno detectado en casi la mitad de los casos (N=17, 44.7%).

En nuestro laboratorio se emplea una PCR multiplex con un panel sindrómico de ITS que permite la detección simultánea de 7 patógenos urogenitales (*C. trachomatis*, *N.*

gonorrhoeae, *M. genitalium*, *T. vaginalis*, *M. hominis*, *U. urealyticum* y *U. parvum*) (221). Si embargo, y de acuerdo con las guías actuales (92, 148), la detección de *M. genitalium* está únicamente indicada en pacientes sintomáticos o en las parejas de pacientes infectados, con el objetivo de evitar tratamientos antibióticos innecesarios que den lugar a la generación de resistencias (222, 223). Se detectaron coinfecciones de *M. genitalium* con otros agentes, como *C. trachomatis* (N=1, 2.6%), *N. gonorrhoeae* (N=3, 7.9%) o *Treponema pallidum* por detección serológica (N=6, 15.8%, en uno de los casos junto a *N. gonorrhoeae*).

Para ajustarnos a estas recomendaciones con la técnica multiplex que utilizamos en el laboratorio, en el momento de realización de la parte experimental de esta tesis se estableció un algoritmo de trabajo: dado que recibíamos un elevado número de muestras de pacientes asintomáticos por los programas de vigilancia de CT en gente joven, en caso de detectar *M. genitalium*, se consultaba la historia clínica del paciente. En caso de no existir registros acerca de la presencia de sintomatología o de que se tratase de la pareja de un paciente positivo por *M. genitalium*, el resultado no quedaría reflejado en el informe final. En la actualidad, el incremento del volumen de muestras recibidas (unas 300 al día), ha hecho que se instauren una serie de perfiles preconfigurados para que el clínico solicitante especifique si se trata de un cribado en un paciente asintomático (en este caso, solo se informará el resultado de *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae*) o si, por el contrario, solicita un diagnóstico de infección de transmisión sexual en un paciente con síntomas, en cuyo caso se informará la presencia de *M. genitalium* si es detectado.

Otros microorganismos como *Ureaplasma* spp. o *M. hominis* se detectaron en el 31.6% de los pacientes. De la misma forma, estos microorganismos se detectan mediante la PCR multiplex de forma conjunta con los “verdaderos” causantes de ITS. Dado su patogenia incierta y que el beneficio de su tratamiento es controvertido (224), la presencia de estas bacterias se informa únicamente en casos excepcionales para evitar la generación de resistencias.

En cuanto a la detección de resistencias antibióticas, de las 415 muestras positivas por Allplex STI-7 para *M. genitalium*, 21 no tenían suficiente DNA para llevar a cabo el estudio, quedando un total de 394 muestras. La detección de resistencia a macrólidos se llevó a cabo por de la siguiente forma: por pirosecuenciación (N=215), por el reactivo comercial ResistancePlus® MG (N=79), o por ambos métodos en paralelo (N=100). Información detallada en la Figura 2 del artículo.

La pirosecuenciación se empleó como técnica principal en la detección de resistencia a macrólidos, adaptando la técnica previamente utilizada en *M. pneumoniae*. Para asegurar que se trataba de un método robusto, se emplearon 6 muestras de referencia provenientes de controles de calidad, cinco de ellas del Quality Control for Molecular Diagnostics program (QCMD) y una del control de calidad de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

Como técnica comparativa, se empleó el reactivo comercial ResistancePlus® MG, método de un solo paso que permite la detección de *M. genitalium* y de las cinco mutaciones asociadas a resistencia a macrólidos más frecuentes (A2058G, A2059G, A2058T, A2058C o 2059C).

Dado que ResistancePlus® MG además de detectar los patrones de resistencia identifica la bacteria, en el grupo de muestras que se procesaron con ambas técnicas se comparó la detección de *M. genitalium* con nuestra técnica de rutina, Allplex STI-7. La concordancia entre ambas técnicas fue de un 87% (87/100). En los 13 casos discordantes en los que ResistancePlus® MG no detectó *M. genitalium* mientras que Allplex STI-7 informó de su presencia, se comprobó que no se trataba de falsos positivos por Allplex al realizar de forma satisfactoria el análisis del 23S rRNA para la resistencia a macrólidos por pirosecuenciación.

Por tanto, los falsos negativos de ResistancePlus® MG pueden explicarse por diversos motivos, como una baja carga bacteriana o la pérdida de integridad del DNA por un ciclo adicional de congelación-descongelación (ya que las muestras fueron procesadas por Allplex y congeladas a -20°C hasta la realización de ResistancePlus® MG). Otra de las posibilidades es que la diana de ResistancePlus® MG es el gen MgPa, mientras que la de Allplex STI-7 es confidencial. Podría ser que la diana empleada por este último aportase un extra de sensibilidad a esta técnica.

Respecto a la detección de resistencia a macrólidos, la concordancia entre ambas técnicas se elevó hasta un 95.4% (83/87). Entre los cuatro resultados discordantes, una cepa mutante detectada por pirosecuenciación fue informada como negativa por ResistancePlus® MG debido a una detección tardía (Ct >30), lo que corresponde a una baja carga bacteriana. Desafortunadamente, esas cuatro muestras no pudieron ser repetidas por volumen insuficiente.

En el caso de la pirosecuenciación, 72 muestras presentaban mutaciones asociadas a resistencia, siendo la más prevalente A2058G (N=41, 56.9%), seguida de A2059G (N=27,

37.5%), A2058T (N=3, 4.2%) y A2062T (N=1, 1.4%). Esta técnica es relativamente sencilla, flexible, adaptable según las necesidades de cada momento y de bajo coste (siempre que tengas el equipamiento disponible), pero requiere un procesamiento manual más prolongado ejecutado por técnicos formados en la tecnología.

Por el contrario, ResistancePlus® MG es adecuado para laboratorios con una alta carga de trabajo, ya que incluye la detección de *M. genitalium* y resistencia a ML en un solo paso, no requiere la adquisición de equipamientos adicionales a los ya presentes en un laboratorio clínico y permite trabajar con la rapidez requerida por las guías europeas.

Sin embargo, no todo son ventajas. Este ensayo detecta un set de 5 mutaciones en el RNA 23S asociadas a resistencia a macrólidos, por lo que no es adecuado para estudios epidemiológicos ni de investigación al no poder distinguir entre ellas ni de detectar otro tipo de mutaciones (diferentes a sus dianas o no descritas) que pudiesen estar presentes. Además, no existe un control interno de amplificación del gen 23S que asegure que la amplificación para la detección de resistencias se ha producido correctamente. Esto implica que el kit no puede distinguir entre la ausencia de mutación y la ausencia de amplificación del gen 23S rRNA, lo que conlleva un riesgo de obtener resultados falsos de cepa susceptible a macrólidos por falta de amplificación del gen, tal como ya reportaron Le Roy et al. (179).

La prevalencia de resistencia a macrólidos fue de un 23.1%, suponiendo un total de 91 muestras portadoras de una mutación asociada a resistencia. El porcentaje de resistencias se calculó para ambos periodos, observándose un ligero aumento en 2018 (26%) respecto a los dos años previos (22.2%).

El valor obtenido es similar a otros estudios realizados en nuestro país (225-227), ligeramente más elevado que el 16.3% descrito en el País Vasco (228) e inferior al reportado por Salazar et al. en el sur de España (229), teniendo en cuenta que su cohorte incluía un 25% de HSH respecto al 9.1% presente en la nuestra. Si nos centramos en Catalunya, nuestra prevalencia es similar a la descrita por Muñoz Santa et al. en Lleida (23%) (230), y se encuentra entre el 12.6% descrito por Lucena-Nemirosky et al. en la zona Vallés Occidental (84) y el 36.1% reportado por Fernández-Huerta en el centro de Barcelona (231). Además de la diferente localización geográfica (y, por tanto, tipo de población de influencia), el primero se trata de un laboratorio de microbiología que procesa en su mayoría muestras de atención primaria, mientras que el segundo es una unidad específica de ITS, lo que explica el elevado porcentaje en esa ubicación. En nuestro caso, nuestras muestras provenían en su mayor parte de atención primaria pero también de la

unidad de VIH de nuestro centro, lo que explica que nuestro valor sea intermedio entre los dos reflejados anteriormente.

Además, si nos centramos en la cohorte de pacientes VIH, de los cuales el 94.7% eran HSH, la prevalencia de resistencias fue del 73.7% (28/38), y la revisión de historias clínicas reveló la administración de un tratamiento antibiótico previo en el 19.8% de los casos, en la mayoría de los casos un macrólido. Esta elevada tasa de resistencia es concordante con el reportado por Barberá et al. en nuestra región (232), lo que demuestra que los HSH tienen un mayor riesgo de adquirir cepas resistentes, y el estudio de Dionne-Odom et al., que describe una prevalencia de un 74.1% de *M. genitalium* multirresistente en HSH VIH positivos en Alabama (233). A la vista de estos datos, el elevado riesgo de fallos terapéuticos justifica la necesidad de realizar de forma simultánea la detección de *M. genitalium* junto con el análisis de resistencia a ML.

Respecto a la resistencia a fluoroquinolonas, la secuenciación del gen *parC* reveló un 3% (3/100) de cepas portadoras de la mutación Ser83(80)Ile, mientras que las 97 restantes eran genotipo wild-type. Además, las tres cepas resistentes a fluoroquinolonas poseían también mutaciones de resistencia a macrólidos (cepas con resistencia dual), correspondiendo en dos casos a dos hombres con uretritis y la tercera a una joven de 18 años cuya primera muestra (recogida tras un tratamiento empírico extendido con azitromicina) mostraba una mutación A2059G/*parC* genotipo wild-type. Ante este resultado, se pautó un tratamiento con moxifloxacino, y el test-of-cure reveló una cepa con resistencia dual (A2059G/Ser83(80)Ile) tras la terapia con la fluoroquinolona, lo que demuestra la facilidad de adquisición de resistencias en *M. genitalium* tras ser sometido a presión antibiótica.

Nuestra tasa de resistencia a fluoroquinolonas es inferior al 8.8% descrito por Fernández-Huerta et al., Piñeiro et al. (un 7.9%, pero no todas las mutaciones incluidas en este valor total tienen una implicación demostrada in vivo en la resistencia al tratamiento), de Salazar et al. (9.1%) y Adelantado y Beristáin (5.5%), respectivamente (171, 227-229). Sin embargo, nuestros datos son concordantes con los valores de resistencia a quinolonas reportados en el resto de las regiones europeas de la OMS, comparado con los territorios del Pacífico Occidental (143).

Este estudio tiene diversas limitaciones. En primer lugar, nuestra población de estudio incluye tanto pacientes sintomáticos como asintomáticos. Este hecho puede afectar a los valores obtenidos de resistencia a macrólidos o quinolonas, en comparación con otros estudios españoles (229, 231). En segundo lugar, no fue posible procesar todas las

muestras por pirosecuenciación y ResistancePlus® MG simultáneamente. El haber procesado únicamente un grupo de 100 muestras para comparar ambos métodos es una limitación importante, pero nos aporta una visión clara de la utilidad de la pirosecuenciación para este fin. En último lugar, solo se secuenció el gen *parC* para detección de resistencia a quinolonas, por ser la región genómica donde se encuentran de forma más frecuente las mutaciones asociadas al fallo terapéutico con moxifloxacino (167).

En conclusión, este estudio proporciona información valiosa sobre la prevalencia de resistencias a macrólidos y quinolonas en *M. genitalium* en pacientes jóvenes con riesgo de ITS en Badalona, España, país en el que hay escasa información publicada sobre el tema en comparación con otras regiones europeas. La pirosecuenciación, a pesar de ser un método que requiere más tiempo, es una herramienta de bajo coste y útil para la detección de resistencia a macrólidos, útil en estudios epidemiológicos y para el descubrimiento de nuevas mutaciones. Dada la tasa de resistencias detectada en nuestra área, la detección simultánea de *M. genitalium* y su patrón de resistencia a macrólidos, utilizando técnicas caseras o comerciales, debería implantarse en los laboratorios de diagnóstico clínico. Esto permitiría mejorar el manejo de los pacientes al poder aplicar estrategias guiadas por los patrones de resistencia, disminuyendo la proporción de fracasos terapéuticos y los costes totales del proceso.

Tras la realización de los estudios descritos anteriormente, podemos concluir que tanto en *M. pneumoniae* como en *M. genitalium*, la utilidad de los métodos moleculares es de gran valor, tanto en el diagnóstico de ambas especies (complementando otras técnicas si es necesario) como en la detección directa desde muestra clínica de los genes asociados a resistencia antibiótica. En la mayoría de los laboratorios clínicos no es posible la realización de cultivo de estos microorganismos, y el tener la posibilidad de guiar el tratamiento del paciente para conseguir la resolución del cuadro clínico presentado es, hoy en día, más que recomendado a la vista de las tasas de resistencia obtenidas en ambos estudios. La pirosecuenciación se ha mostrado como una técnica versátil, adaptable y de bajo coste que permite la detección de mutaciones a demanda, en diferentes especies de microorganismos y con múltiples posibilidades. En todo caso, el empleo ya sea de esta técnica casera (u otras), o bien de una comercial, complementa el abanico de pruebas disponibles en los laboratorios de microbiología clínica, aportando un valor añadido a nuestro trabajo en el día a día.

4. Conclusiones

Evaluación de la utilidad de las técnicas moleculares en el estudio de *Mycoplasma pneumoniae*:

1. Las técnicas moleculares pueden ser herramientas valiosas para el diagnóstico de *M. pneumoniae*, aportando una elevada sensibilidad y permitiendo el estudio de brotes epidémicos mediante el tipado molecular de las cepas o la detección de sus patrones de resistencia.
2. La PCR multiplex en la detección de *M. pneumoniae* es una herramienta que incrementa la sensibilidad diagnóstica, permitiendo identificar de manera simultánea otros patógenos causantes de neumonía atípica, con el inconveniente de considerar como pacientes infectados a los portadores asintomáticos.
3. El empleo conjunto de la serología con la PCR aporta una sensibilidad y especificidad óptima que mejora el abordaje diagnóstico de esta entidad.
4. El MLVA es una herramienta con alta capacidad de discriminación útil en la evaluación de los genotipos circulantes de *M. pneumoniae* durante los picos epidémicos, permitiendo la detección precoz de brotes causados por un genotipo concreto.
5. El estudio de genotipos circulantes por MLVA nos permite la intercomparación con otros países y regiones, conociendo en cada momento cuáles son las cepas circulantes.
6. La caracterización de cepas por esta metodología no solamente se restringe a estudios epidemiológicos, si no que ha permitido la diferenciación entre infecciones persistentes o reinfecciones en los individuos estudiados.
7. La prevalencia de resistencia a macrólidos en nuestro territorio, a pesar de no ser demasiado elevada (8%), debe ser un factor a tener en cuenta durante el manejo terapéutico de los pacientes.
8. La capacidad de adquisición de resistencia a macrólidos en *M. pneumoniae* por presión antibiótica ha demostrado ser preocupante, hasta el punto de que dos únicas dosis de azitromicina fueron capaces de inducir una mutación asociada a resistencia en uno de los pacientes estudiados.

9. La ausencia de brotes detectados durante el estudio no permitió demostrar la capacidad de diseminación de las cepas resistentes. Sin embargo, en uno de los pacientes con una cepa resistente a macrólidos, el único antecedente encontrado fue un tratamiento previo a su hermano con este tipo de terapia.
10. A pesar de que los cuadros clínicos producidos por una cepa resistente se resolvieron incluso con el empleo de macrólidos, la información acerca del perfil de resistencia puede ser útil especialmente en si la evolución clínica es desfavorable o en aquellos casos de infección extrarrespiratoria.
11. La capacidad de adquisición de resistencia a macrólidos en *M. pneumoniae* por presión antibiótica ha demostrado ser preocupante, hasta el punto de que dos únicas dosis de azitromicina fueron capaces de inducir una mutación asociada a resistencia en uno de los pacientes estudiados.
12. Dado que la infección se resuelve de forma espontánea en la mayoría de los casos, sería necesario considerar de forma individualizada en el contexto de cada paciente si el tratamiento antimicrobiano puede aportar algún beneficio concreto.

Aplicación de técnicas moleculares al estudio de *Mycoplasma genitalium*:

13. La pirosecuenciación ha mostrado ser un método robusto, de bajo coste y versátil, que permite su empleo en diferentes microorganismos o clases antibióticas, adaptando el método de forma sencilla.
14. Esta tecnología es útil tanto para la rutina diagnóstica, aportando el perfil de sensibilidad o resistencia a los macrólidos, como a nivel epidemiológico, permitiendo la caracterización de las mutaciones en un área concreta y la detección de nuevas mutaciones.
15. La adaptación de la pirosecuenciación como técnica casera en dos pasos para el estudio de *M. genitalium* fue exitosa, mostrando una elevada concordancia con la técnica comercial de un solo paso ResistancePlus® MG kit.
16. Los reactivos comerciales permiten su inclusión sencilla en las rutinas diagnósticas de los laboratorios clínicos al no requerir ningún tipo de equipamiento adicional. Sin

embargo, su coste es más elevado y solo permiten la detección de las mutaciones que tengan incluidas por defecto.

17. La prevalencia de mutaciones genéticas asociadas a resistencia a macrólidos detectada (23%) justifica la necesidad de la realización de este tipo de estudios tras el diagnóstico de una infección por *M. genitalium* de forma rutinaria, especialmente en el colectivo de HSH infectados por VIH.
18. La realización del análisis de resistencia a macrólidos de forma rutinaria permitiría la instauración de estrategias de Resistance-Guided Therapy que mejorarían el manejo de nuestros pacientes.
19. La prevalencia de resistencias a fluoroquinolonas detectada (3%) no es muy elevada en el conjunto de muestras estudiadas. Sin embargo, las tres muestras detectadas presentaban un patrón de resistencia dual, por lo que su realización estaría indicada en los casos de fracaso terapéutico y para la monitorización periódica de la situación en nuestro área.

5. Bibliografía

1. Krass CJ, Gardner MW. Etymology of the Term Mycoplasma. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1973;23(1):62-4.
2. Nocard E, and E. R. Roux. Le microbe de la peripneumonie. *Ann Inst Pasteur (Paris)*. 1898;12:240–62.
3. Klieneberger E. The natural occurrence of pleuropneumonia-like organisms in apparent symbiosis with *Streptobacillus moniliformis* and other bacteria. *J Pathol Bacteriol*. 1935;40:93–105.
4. Dienes L, Edsall G. Observations on the L-Organism of Klieneberger. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1937;36(5):740-4.
5. Eaton MD, Meiklejohn G, van Herick W. Studies on the etiology of primary atypical pneumonia: a filterable agent transmissible to cotton rats, hamsters, and chick embryos. *J Exp Med*. 1944;79(6):649-68.
6. Chanock RM, Rifkind D, Kravetz HM, Kinght V, Johnson KM. Respiratory disease in volunteers infected with Eaton agent: a preliminary report. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1961;47(6):887-90.
7. Shepard MC. The recovery of pleuropneumonia-like organisms from Negro men with and without nongonococcal urethritis. *Am J Syph Gonorrhea Vener Dis*. 1954;38(2):113-24.
8. Marmion BP, Goodburn GM. Effect of an organic gold salt on Eaton's primary atypical pneumonia agent and other observations. *Nature*. 1961;189:247-8.
9. Clyde WA, Jr. Demonstration of Eaton's agent in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1961;107:715-8.
10. Chanock RM, Hayflick L, Barile MF. Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and its identification as a PPLO. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1962;48:41-9.
11. Chanock RM. *Mycoplasma pneumoniae*: proposed nomenclature for atypical pneumonia organism (Eaton agent). *Science*. 1963;140(3567):662.
12. Taylor-Robinson D, Tully JG, Furr PM, Cole RM, Rose DL, Hanna NF. Urogenital mycoplasma infections of man: a review with observations on a recently discovered mycoplasma. *Isr J Med Sci*. 1981;17(7):524-30.
13. Tully JG, Taylor-Robinson D, Cole RM, Rose DL. A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract. *Lancet*. 1981;1(8233):1288-91.

14. Del Giudice RA, Tully JG, Rose DL, Cole RM. *Mycoplasma pirum* sp. nov., a Terminal Structured Mollicute from Cell Cultures. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1985;35(3):285-91.
15. Hill AC. *Mycoplasma spermatophilum*, a new species isolated from human spermatozoa and cervix. *Int J Syst Bacteriol*. 1991;41(2):229-33.
16. Lo SC, Hayes MM, Tully JG, Wang RY, Kotani H, Pierce PF, et al. *Mycoplasma penetrans* sp. nov., from the urogenital tract of patients with AIDS. *Int J Syst Bacteriol*. 1992;42(3):357-64.
17. Pitcher DG, Windsor D, Windsor H, Bradbury JM, Yavari C, Jensen JS, et al. *Mycoplasma amphoriforme* sp. nov., isolated from a patient with chronic bronchopneumonia. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2005;55(Pt 6):2589-94.
18. Gibbons NE, Murray RGE. Proposals Concerning the Higher Taxa of Bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1978;28(1):1-6.
19. International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of *Mollicutes*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1993;43(2):394-7.
20. Bergey DH, Krieg NR, Holt JG. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, MD: Williams & Wilkins; 1984.
21. Brown DR. Tenericutes. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. p. 1-3.
22. Woese CR, Maniloff J, Zablen LB. Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980;77(1):494-8.
23. Taylor-Robinson D. Infections due to species of *Mycoplasma* and *Ureaplasma*: an update. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1996;23(4):671-82; quiz 83-4.
24. Gomez Rufo D, Garcia Sanchez E, Garcia Sanchez JE, Garcia Moro M. Clinical implications of the genus *Mycoplasma*. *Rev Esp Quimioter*. 2021;34(3):169-84.
25. Wilson MH, Collier AM. Ultrastructural study of *Mycoplasma pneumoniae* in organ culture. *J Bacteriol*. 1976;125(1):332-9.
26. Drexler HG, Uphoff CC. *Mycoplasma* contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*. 2002;39(2):75-90.
27. Inamine JM, Ho KC, Loechel S, Hu PC. Evidence that UGA is read as a tryptophan codon rather than as a stop codon by *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium*, and *Mycoplasma gallisepticum*. *J Bacteriol*. 1990;172(1):504-6.

28. Goulet M, Dular R, Tully JG, Billowes G, Kasatiya S. Isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from the human urogenital tract. *Journal of clinical microbiology*. 1995;33(11):2823-5.
29. Meyer RD, Clough W. Extragenital *Mycoplasma hominis* infections in adults: emphasis on immunosuppression. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1993;17 Suppl 1:S243-9.
30. Gass R, Fisher J, Badesch D, Zamora M, Weinberg A, Melsness H, et al. Donor-to-host transmission of *Mycoplasma hominis* in lung allograft recipients. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1996;22(3):567-8.
31. Marshall AJ, Miles RJ, Richards L. The phagocytosis of mycoplasmas. *Journal of medical microbiology*. 1995;43(4):239-50.
32. Jensen JS, Blom J, Lind K. Intracellular location of *Mycoplasma genitalium* in cultured Vero cells as demonstrated by electron microscopy. *International journal of experimental pathology*. 1994;75(2):91-8.
33. Taylor-Robinson D, Davies HA, Sarathchandra P, Furr PM. Intracellular location of mycoplasmas in cultured cells demonstrated by immunocytochemistry and electron microscopy. *International journal of experimental pathology*. 1991;72(6):705-14.
34. Rottem S. Invasion of Mycoplasmas into and Fusion with Host Cells. In: Razin S, Herrmann R, editors. *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. Boston, MA: Springer US; 2002. p. 391-401.
35. Lo S-C. Apoptotic, Antiapoptotic, Clastogenic and Oncogenic Effects. In: Razin S, Herrmann R, editors. *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. Boston, MA: Springer US; 2002. p. 403-16.
36. Yogev D, Browning GF, Wise KS. Genetic Mechanisms of Surface Variation. In: Razin S, Herrmann R, editors. *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. Boston, MA: Springer US; 2002. p. 417-43.
37. Mühlradt PF. Immunomodulation by Mycoplasmas: Artifacts, Facts and Active Molecules. In: Razin S, Herrmann R, editors. *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. Boston, MA: Springer US; 2002. p. 445-72.
38. Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62(4):1094-156.
39. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases vol.12012*.

40. Atkinson TP, Balish MF, Waites KB. Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *FEMS microbiology reviews*. 2008;32(6):956-73.
41. Himmelreich R, Hilbert H, Plagens H, Pirkl E, Li BC, Herrmann R. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic acids research*. 1996;24(22):4420-49.
42. Chanock RM, Mufson MA, Somerson NL, Couch RB. Role of *Mycoplasma* (Pplo) in Human Respiratory Disease. *Am Rev Respir Dis*. 1963;88:Suppl 218-39.
43. Miyata M. Gliding motility of mycoplasma--a mechanism cannot be explained by today's biology. *Nihon Saikingaku Zasshi*. 2002;57(4):581-95.
44. Waites KB, Xiao L, Liu Y, Balish MF, Atkinson TP. *Mycoplasma pneumoniae* from the Respiratory Tract and Beyond. *Clinical microbiology reviews*. 2017;30(3):747-809.
45. Großhennig S, Ischebeck T, Gibhardt J, Busse J, Feussner I, Stülke J. Hydrogen sulfide is a novel potential virulence factor of *Mycoplasma pneumoniae*: characterization of the unusual cysteine desulfurase/desulphydrase HapE. *Molecular Microbiology*. 2016;100(1):42-54.
46. Waites KB, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Clinical microbiology reviews*. 2004;17(4):697-728, table of contents.
47. Su X, You X, Luo H, Liang K, Chen L, Tian W, et al. Community-Acquired Respiratory Distress Syndrome Toxin: Unique Exotoxin for *M. pneumoniae*. *Frontiers in microbiology*. 2021;12:766591.
48. Lluch-Senar M, Delgado J, Chen WH, Llorens-Rico V, O'Reilly FJ, Wodke JA, et al. Defining a minimal cell: essentiality of small ORFs and ncRNAs in a genome-reduced bacterium. *Mol Syst Biol*. 2015;11(1):780.
49. Feng M, Schaff AC, Balish MF. *Mycoplasma pneumoniae* biofilms grown in vitro: traits associated with persistence and cytotoxicity. *Microbiology (Reading)*. 2020;166(7):629-40.
50. Yoshikawa E, Tamiya S, Inoue Y, Suzuki K, Yoshioka Y. Vaccine using community-acquired respiratory distress syndrome toxin as an antigen against *Mycoplasma pneumoniae* in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2022;594:81-7.
51. Kornspan JD, Tarshis M, Rottem S. Adhesion and biofilm formation of *Mycoplasma pneumoniae* on an abiotic surface. *Arch Microbiol*. 2011;193(11):833-6.
52. Simmons WL, Daubenspeck JM, Osborne JD, Balish MF, Waites KB, Dybvig K. Type 1 and type 2 strains of *Mycoplasma pneumoniae* form different biofilms. *Microbiology (Reading)*. 2013;159(Pt 4):737-47.

53. Jacobs E, Ehrhardt I, Dumke R. New insights in the outbreak pattern of *Mycoplasma pneumoniae*. International journal of medical microbiology : IJMM. 2015;305(7):705-8.
54. Loens K, Goossens H, Ieven M. Acute respiratory infection due to *Mycoplasma pneumoniae*: current status of diagnostic methods. European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2010;29(9):1055-69.
55. Onozuka D, Hashizume M, Hagihara A. Impact of weather factors on *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. Thorax. 2009;64(6):507-11.
56. Onozuka D, Chaves LF. Climate Variability and Nonstationary Dynamics of *Mycoplasma pneumoniae* Pneumonia in Japan. PloS one. 2014;9(4):e95447.
57. Waites KB. New concepts of *Mycoplasma pneumoniae* infections in children. Pediatric pulmonology. 2003;36(4):267-78.
58. Foy HM, Grayston JT, Kenny GE, Alexander ER, McMahan R. Epidemiology of *Mycoplasma pneumoniae* Infection in Families. JAMA. 1966;197(11):859-66.
59. Aguilera-Alonso D, Ruiz R, Rubiano J, García M, García I, Ocete M, et al. Epidemiological and clinical analysis of community-acquired *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children from a Spanish population, 2010–2015. Anales de Pediatría (English Edition). 2019;91.
60. Beeton ML, Zhang XS, Uldum SA, Bebear C, Dumke R, Gullsby K, et al. *Mycoplasma pneumoniae* infections, 11 countries in Europe and Israel, 2011 to 2016. Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin. 2020;25(2).
61. Caballero Jde D, del Campo R, Mafe Mdel C, Galvez M, Rodriguez-Dominguez M, Canton R, et al. First report of macrolide resistance in a *Mycoplasma pneumoniae* isolate causing community-acquired pneumonia in Spain. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2014;58(2):1265-6.
62. Zhang XS, Zhao H, Vynnycky E, Chalker V. Positively interacting strains that co-circulate within a network structured population induce cycling epidemics of *Mycoplasma pneumoniae*. Scientific reports. 2019;9(1):541.
63. Chalker VJ, Stocki T, Mentasti M, Fleming D, Sadler C, Ellis J, et al. *Mycoplasma pneumoniae* infection in primary care investigated by real-time PCR in England and Wales. European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2011;30(7):915-21.
64. Walter ND, Grant GB, Bandy U, Alexander NE, Winchell JM, Jordan HT, et al. Community Outbreak of *Mycoplasma pneumoniae* Infection: School-Based Cluster of

Neurologic Disease Associated with Household Transmission of Respiratory Illness. *The Journal of infectious diseases*. 2008;198(9):1365-74.

65. Rhea SK, Cox SW, Moore ZS, Mays ER, Benitez AJ, Diaz MH, et al. Notes from the field: atypical pneumonia in three members of an extended family - South Carolina and north Carolina, july-august 2013. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2014;63(33):734-5.

66. Diaz MH, Benitez AJ, Winchell JM. Investigations of *Mycoplasma pneumoniae* infections in the United States: trends in molecular typing and macrolide resistance from 2006 to 2013. *Journal of clinical microbiology*. 2015;53(1):124-30.

67. Yamazaki T, Kenri T. Epidemiology of *Mycoplasma pneumoniae* Infections in Japan and Therapeutic Strategies for Macrolide-Resistant *M. pneumoniae*. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:693.

68. Mansel JK, Rosenow EC, 3rd, Smith TF, Martin JW, Jr. *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *Chest*. 1989;95(3):639-46.

69. Kannan TR, Hardy RD, Coalson JJ, Cavuoti DC, Siegel JD, Cagle M, et al. Fatal outcomes in family transmission of *Mycoplasma pneumoniae*. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2012;54(2):225-31.

70. Larsen JM, Brix S, Thyssen AH, Birch S, Rasmussen MA, Bisgaard H. Children with asthma by school age display aberrant immune responses to pathogenic airway bacteria as infants. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(4):1008-13.

71. Martin RJ, Kraft M, Chu HW, Berns EA, Cassell GH. A link between chronic asthma and chronic infection. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107(4):595-601.

72. Sutherland ER, King TS, Icitovic N, Ameredes BT, Bleecker E, Boushey HA, et al. A trial of clarithromycin for the treatment of suboptimally controlled asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(4):747-53.

73. Zha L, Shen J, Tefsen B, Wang Y, Lu W, Xu Q. Clinical features and outcomes of adult COVID-19 patients co-infected with *Mycoplasma pneumoniae*. *The Journal of infection*. 2020;81(3):e12-e5.

74. Narita M. Classification of Extrapulmonary Manifestations Due to *Mycoplasma pneumoniae* Infection on the Basis of Possible Pathogenesis. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:23.

75. Wetter DA, Camilleri MJ. Clinical, etiologic, and histopathologic features of Stevens-Johnson syndrome during an 8-year period at Mayo Clinic. *Mayo Clinic proceedings*. 2010;85(2):131-8.

76. Narita M. Central nervous system involvement by *Mycoplasma pneumoniae*. *Clin Mol Pathol*. 1995;48(4):M219.

77. Narita M. Pathogenesis of extrapulmonary manifestations of *Mycoplasma pneumoniae* infection with special reference to pneumonia. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*. 2010;16(3):162-9.
78. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas y Bennett compendio de enfermedades infecciosas / [editado por]: John E. Bennett, MD, MACP, Raphael Dolin, MD, Martin J. Blaser, MD. Mandell, Douglas, and Bennett's infectious disease essentials. Castellano. Barcelona: Elsevier; 2017.
79. Taylor-Robinson D, Jensen JS. *Mycoplasma genitalium*: from Chrysalis to multicolored butterfly. *Clinical microbiology reviews*. 2011;24(3):498-514.
80. Fraser CM, Gocayne JD, White O, Adams MD, Clayton RA, Fleischmann RD, et al. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*. 1995;270(5235):397-403.
81. Gibson DG, Benders GA, Andrews-Pfannkoch C, Denisova EA, Baden-Tillson H, Zaveri J, et al. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science*. 2008;319(5867):1215-20.
82. Maniloff J. The minimal cell genome: "on being the right size". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(19):10004-6.
83. Taylor-Robinson D, Furr PM. Failure of *Mycoplasma pneumoniae* infection to confer protection against *Mycoplasma genitalium*: observations from a mouse model. *Journal of medical microbiology*. 2001;50(4):383-4.
84. Lucena Nemirosky J, Espelt R, Lopez Grado E, Sobrino J, Acera A, Perez J, et al. Macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium* in Catalonia, Spain: a 1 year prospective study. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2021.
85. McGowin CL, Anderson-Smits C. *Mycoplasma genitalium*: an emerging cause of sexually transmitted disease in women. *PLoS pathogens*. 2011;7(5):e1001324.
86. Manhart LE, Gaydos CA, Taylor SN, Lillis RA, Hook EW, 3rd, Klausner JD, et al. Characteristics of *Mycoplasma genitalium* Urogenital Infections in a Diverse Patient Sample from the United States: Results from the Aptima *Mycoplasma genitalium* Evaluation Study (AMES). *Journal of clinical microbiology*. 2020;58(7).
87. Baumann L, Cina M, Egli-Gany D, Goutaki M, Halbeisen FS, Lohrer GR, et al. Prevalence of *Mycoplasma genitalium* in different population groups: systematic review and meta-analysis. *Sexually transmitted infections*. 2018;94(4):255-62.
88. Soni S, Alexander S, Verlander N, Saunders P, Richardson D, Fisher M, et al. The prevalence of urethral and rectal *Mycoplasma genitalium* and its associations in men who have sex with men attending a genitourinary medicine clinic. *Sexually transmitted infections*. 2010;86(1):21-4.

89. Francis SC, Kent CK, Klausner JD, Rauch L, Kohn R, Hardick A, et al. Prevalence of rectal *Trichomonas vaginalis* and *Mycoplasma genitalium* in male patients at the San Francisco STD clinic, 2005-2006. *Sexually transmitted diseases*. 2008;35(9):797-800.
90. Bissessor M, Tabrizi SN, Bradshaw CS, Fairley CK, Hocking JS, Garland SM, et al. The contribution of *Mycoplasma genitalium* to the aetiology of sexually acquired infectious proctitis in men who have sex with men. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2016;22(3):260-5.
91. Read TRH, Murray GL, Danielewski JA, Fairley CK, Doyle M, Worthington K, et al. Symptoms, Sites, and Significance of *Mycoplasma genitalium* in Men Who Have Sex with Men. *Emerging infectious diseases*. 2019;25(4):719-27.
92. Jensen JS, Cusini M, Gomberg M, Moi H, Wilson J, Unemo M. 2021 European guideline on the management of *Mycoplasma genitalium* infections. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 2022.
93. Horner PJ, Taylor-Robinson D. Association of *Mycoplasma genitalium* with balanoposthitis in men with non-gonococcal urethritis. *Sexually transmitted infections*. 2011;87(1):38-40.
94. Krieger JN, Riley DE, Roberts MC, Berger RE. Prokaryotic DNA sequences in patients with chronic idiopathic prostatitis. *Journal of clinical microbiology*. 1996;34(12):3120-8.
95. Mandar R, Raukas E, Turk S, Korrovits P, Punab M. Mycoplasmas in semen of chronic prostatitis patients. *Scand J Urol Nephrol*. 2005;39(6):479-82.
96. Eickhoff JH, Frimodt-Moller N, Walter S, Frimodt-Moller C. A double-blind, randomized, controlled multicentre study to compare the efficacy of ciprofloxacin with pivampicillin as oral therapy for epididymitis in men over 40 years of age. *BJU Int*. 1999;84(7):827-34.
97. Doble A, Thomas BJ, Walker MM, Harris JR, Witherow RO, Taylor-Robinson D. The role of *Chlamydia trachomatis* in chronic abacterial prostatitis: a study using ultrasound guided biopsy. *J Urol*. 1989;141(2):332-3.
98. Moi H, Reinton N, Moghaddam A. *Mycoplasma genitalium* in women with lower genital tract inflammation. *Sexually transmitted infections*. 2009;85(1):10-4.
99. Lis R, Rowhani-Rahbar A, Manhart LE. *Mycoplasma genitalium* infection and female reproductive tract disease: a meta-analysis. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2015;61(3):418-26.

100. Sasaki Y, Honda M, Makino M, Sasaki T. Mycoplasmas stimulate replication of human immunodeficiency virus type 1 through selective activation of CD4+ T lymphocytes. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1993;9(8):775-80.
101. Napierala Mavedzenge S, Weiss HA. Association of *Mycoplasma genitalium* and HIV infection: a systematic review and meta-analysis. *AIDS*. 2009;23(5):611-20.
102. Vandepitte J, Weiss HA, Bukonya J, Kyakuwa N, Muller E, Buve A, et al. Association between *Mycoplasma genitalium* infection and HIV acquisition among female sex workers in Uganda: evidence from a nested case-control study. *Sexually transmitted infections*. 2014;90(7):545-9.
103. Tully JG, Rose DL, Whitcomb RF, Wenzel RP. Enhanced isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from throat washings with a newly-modified culture medium. *The Journal of infectious diseases*. 1979;139(4):478-82.
104. Acosta, B, Codina MG, Matas L y Meseguer MA. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Mycoplasma* spp. y *Ureaplasma* spp. 2011. 40. Maria Antonia Meseguer (coordinadora). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2011.
105. Waites KB, Bébéar CM, Roberston JA, Talkington DF, Kenny GE, editors. *Cumitech 34, Laboratory diagnosis of mycoplasmal infections*. Washington D.C.: American Society for Microbiology; 2001.
106. Matas L. y Ausina V. Diagnóstico serológico de las infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*. Control de Calidad de la SEIMC (CCS). Disponible en: www.seimc.org › ccs › revisionestematicas › serologia › Mpneumoniae.
107. Templeton KE, Scheltinga SA, Graffelman AW, Van Schie JM, Crielaard JW, Sillekens P, et al. Comparison and evaluation of real-time PCR, real-time nucleic acid sequence-based amplification, conventional PCR, and serology for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae*. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(9):4366-71.
108. Csango PA, Pedersen JE, Hess RD. Comparison of four *Mycoplasma pneumoniae* IgM-, IgG- and IgA-specific enzyme immunoassays in blood donors and patients. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2004;10(12):1094-8.
109. Matas L, Dominguez J, De Ory F, Garcia N, Gali N, Cardona PJ, et al. Evaluation of Meridian ImmunoCard Mycoplasma test for the detection of *Mycoplasma pneumoniae*-specific IgM in paediatric patients. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 1998;30(3):289-93.

110. He XY, Wang XB, Zhang R, Yuan ZJ, Tan JJ, Peng B, et al. Investigation of *Mycoplasma pneumoniae* infection in pediatric population from 12,025 cases with respiratory infection. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2013;75(1):22-7.
111. Loens K, Ieven M. *Mycoplasma pneumoniae*: Current Knowledge on Nucleic Acid Amplification Techniques and Serological Diagnostics. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:448.
112. Shipitsyna E, Unemo M. A profile of the FDA-approved and CE/IVD-marked Aptima *Mycoplasma genitalium* assay (Hologic) and key priorities in the management of *M. genitalium* infections. *Expert Rev Mol Diagn*. 2020;20(11):1063-74.
113. Pereyre S, Tardy F, Renaudin H, Cauvin E, Del Pra Netto Machado L, Tricot A, et al. Identification and subtyping of clinically relevant human and ruminant mycoplasmas by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(10):3314-23.
114. Xiao D, Zhao F, Zhang H, Meng F, Zhang J. Novel strategy for typing *Mycoplasma pneumoniae* isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry coupled with ClinProTools. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(8):3038-43.
115. Naumann D, Helm D, Labischinski H. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature*. 1991;351(6321):81-2.
116. Wang-Wang JH, Bordoy AE, Martró E, Quesada MD, Pérez-Vázquez M, Guerrero-Murillo M, et al. Evaluation of Fourier Transform Infrared Spectroscopy as a First-Line Typing Tool for the Identification of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Outbreaks in the Hospital Setting. *Frontiers in microbiology*. 2022;13.
117. Wehbe K, Vezzalini M, Cinque G. Detection of mycoplasma in contaminated mammalian cell culture using FTIR microspectroscopy. *Anal Bioanal Chem*. 2018;410(12):3003-16.
118. Pocasap P WN, Junhom C, Phiboonchaiyanan PP, Srisayam M, Nonpunya A, Siriwarin B, Khamphio M, Nanok C, Thumanu K, Tanthanuch W, Barusrux S. TIR Microspectroscopy for the Assessment of Mycoplasmas in HepG2 Cell Culture. *Appl Sci*. 2020;10(11):3766.
119. Dumke R. Molecular Tools for Typing *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *Frontiers in microbiology*. 2022;13.
120. Ma L, Martin DH. Single-nucleotide polymorphisms in the rRNA operon and variable numbers of tandem repeats in the lipoprotein gene among *Mycoplasma genitalium* strains from clinical specimens. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(10):4876-8.

121. Hjorth SV, Bjornelius E, Lidbrink P, Falk L, Dohn B, Berthelsen L, et al. Sequence-based typing of *Mycoplasma genitalium* reveals sexual transmission. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(6):2078-83.
122. Guiraud J, Lounnas M, Boissiere A, Le Roy C, Elguero E, Banuls AL, et al. Lower *mgpB* diversity in macrolide-resistant *Mycoplasma genitalium* infecting men visiting two sexually transmitted infection clinics in Montpellier, France. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2021;76(1):43-7.
123. Fernandez-Huerta M, Serra-Pladevall J, Esperalba J, Moreno-Mingorance A, Fernandez-Naval C, Barbera MJ, et al. Single-Locus-Sequence-Based Typing of the *mgpB* Gene Reveals Transmission Dynamics in *Mycoplasma genitalium*. *Journal of clinical microbiology*. 2020;58(4).
124. Degrange S, Cazanave C, Charron A, Renaudin H, Bebear C, Bebear CM. Development of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae*. *Journal of clinical microbiology*. 2009;47(4):914-23.
125. Yan C, Sun H, Lee S, Selvarangan R, Qin X, Tang YW, et al. Comparison of Molecular Characteristics of *Mycoplasma pneumoniae* Specimens Collected from the United States and China. *Journal of clinical microbiology*. 2015;53(12):3891-3.
126. Unemo M, Dillon JA. Review and international recommendation of methods for typing *Neisseria gonorrhoeae* isolates and their implications for improved knowledge of gonococcal epidemiology, treatment, and biology. *Clinical microbiology reviews*. 2011;24(3):447-58.
127. Cazanave C, Charron A, Renaudin H, Bebear C. Method comparison for molecular typing of French and Tunisian *Mycoplasma genitalium*-positive specimens. *Journal of medical microbiology*. 2012;61(Pt 4):500-6.
128. Brown RJ, Holden MT, Spiller OB, Chalker VJ. Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for Molecular Typing of *Mycoplasma pneumoniae*. *Journal of clinical microbiology*. 2015;53(10):3195-203.
129. Touati A, Blouin Y, Sirand-Pugnet P, Renaudin H, Oishi T, Vergnaud G, et al. Molecular Epidemiology of *Mycoplasma pneumoniae*: Genotyping Using Single Nucleotide Polymorphisms and SNaPshot Technology. *Journal of clinical microbiology*. 2015;53(10):3182-94.
130. Dumke R, Rodriguez N. Use of different approaches for the culture-independent typing of *Mycoplasma pneumoniae* from two geographically distinct regions. *Journal of microbiological methods*. 2021;186:106239.

131. Menendez R, Torres A, Aspa J, Capelastegui A, Prat C, Rodriguez de Castro F, et al. Community acquired pneumonia. New guidelines of the Spanish Society of Chest Diseases and Thoracic Surgery (SEPAR). Arch Bronconeumol. 2010;46(10):543-58.
132. Andres-Martin A, Escribano Montaner A, Figuerola Mulet J, Garcia Garcia ML, Korta Murua J, Moreno-Perez D, et al. Consensus Document on Community-Acquired Pneumonia in Children. SENP-SEPAR-SEIP. Arch Bronconeumol (Engl Ed). 2020;56(11):725-41.
133. Gullsby K, Olsen B, Bondeson K. Molecular Typing of *Mycoplasma pneumoniae* Strains in Sweden from 1996 to 2017 and the Emergence of a New P1 Cytadhesin Gene, Variant 2e. Journal of clinical microbiology. 2019;57(6).
134. Kogoj R, Mrvic T, Praprotnik M, Kese D. Prevalence, genotyping and macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* among isolates of patients with respiratory tract infections, Central Slovenia, 2006 to 2014. Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin. 2015;20(37).
135. Pereyre S, Touati A, Petitjean-Lecherbonnier J, Charron A, Vabret A, Bebear C. The increased incidence of *Mycoplasma pneumoniae* in France in 2011 was polyclonal, mainly involving *M. pneumoniae* type 1 strains. Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2013;19(4):E212-7.
136. Brown RJ, Macfarlane-Smith L, Phillips S, Chalker VJ. Detection of macrolide resistant *Mycoplasma pneumoniae* in England, September 2014 to September 2015. Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin. 2015;20(48):30078.
137. Ferguson GD, Gadsby NJ, Henderson SS, Hardie A, Kalima P, Morris AC, et al. Clinical outcomes and macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* infection in Scotland, UK. Journal of medical microbiology. 2013;62(Pt 12):1876-82.
138. Chironna M, Sallustio A, Esposito S, Perulli M, Chinellato I, Di Bari C, et al. Emergence of macrolide-resistant strains during an outbreak of *Mycoplasma pneumoniae* infections in children. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2011;66(4):734-7.
139. Zhou Y, Zhang Y, Sheng Y, Zhang L, Shen Z, Chen Z. More complications occur in macrolide-resistant than in macrolide-sensitive *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2014;58(2):1034-8.
140. Mikasa K, Aoki N, Aoki Y, Abe S, Iwata S, Ouchi K, et al. JAID/JSC Guidelines for the Treatment of Respiratory Infectious Diseases: The Japanese Association for Infectious Diseases/Japanese Society of Chemotherapy - The JAID/JSC Guide to Clinical Management of Infectious Disease/Guideline-preparing Committee Respiratory Infectious

- Disease WG. Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy. 2016;22(7 Suppl):S1-S65.
141. Baum SG. *Mycoplasma pneumoniae* infection in adults. UpToDate, Post TW (Ed), UpToDate, Waltham, MA (Accessed on April 21, 2022).
142. Lee YR, Jacobs KL. Leave it to Lefamulin: A Pleuromutilin Treatment Option in Community-Acquired Bacterial Pneumonia. *Drugs*. 2019;79(17):1867-76.
143. Machalek DA, Tao Y, Shilling H, Jensen JS, Unemo M, Murray G, et al. Prevalence of mutations associated with resistance to macrolides and fluoroquinolones in *Mycoplasma genitalium*: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious diseases*. 2020;20(11):1302-14.
144. Fernandez-Huerta M, Barbera MJ, Serra-Pladevall J, Esperalba J, Martinez-Gomez X, Centeno C, et al. *Mycoplasma genitalium* and antimicrobial resistance in Europe: a comprehensive review. *International journal of STD & AIDS*. 2020;31(3):190-7.
145. Bissessor M, Tabrizi SN, Twin J, Abdo H, Fairley CK, Chen MY, et al. Macrolide resistance and azithromycin failure in a *Mycoplasma genitalium*-infected cohort and response of azithromycin failures to alternative antibiotic regimens. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2015;60(8):1228-36.
146. Read TRH, Fairley CK, Murray GL, Jensen JS, Danielewski J, Worthington K, et al. Outcomes of Resistance-guided Sequential Treatment of *Mycoplasma genitalium* Infections: A Prospective Evaluation. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2019;68(4):554-60.
147. Australian STI management guidelines for use in primary care: *Mycoplasma genitalium*. <https://sti.guidelines.org.au/sexually-transmissible-infections/mycoplasma-genitalium>. 2021. Last accessed in April 28, 2022.
148. Soni S, Horner P, Rayment M, Pinto-Sander N, Naous N, Parkhouse A, et al. British Association for Sexual Health and HIV national guideline for the management of infection with *Mycoplasma genitalium* (2018). *International journal of STD & AIDS*. 2019;30(10):938-50.
149. Chernova OA, Chernov VM, Mouzykantov AA, Baranova NB, Edelstein IA, Aminov RI. Antimicrobial drug resistance mechanisms among *Mollicutes*. *International journal of antimicrobial agents*. 2021;57(2):106253.
150. Cobos-Trigueros N, Ateka O, Pitart C, Vila J. Macrolides and ketolides. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*. 2009;27(7):412-8.

151. Waites KB, Crabb DM, Duffy LB. Comparative in vitro susceptibilities of human mycoplasmas and ureaplasmas to a new investigational ketolide, CEM-101. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(5):2139-41.
152. Pereyre S, Goret J, Bebear C. *Mycoplasma pneumoniae*: Current Knowledge on Macrolide Resistance and Treatment. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:974.
153. van der Schalk TE, Braam JF, Kusters JG. Molecular basis of antimicrobial resistance in *Mycoplasma genitalium*. *International journal of antimicrobial agents*. 2020;55(4):105911.
154. Pereyre S, Guyot C, Renaudin H, Charron A, Bebear C, Bebear CM. In vitro selection and characterization of resistance to macrolides and related antibiotics in *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(2):460-5.
155. Liu X, Jiang Y, Chen X, Li J, Shi D, Xin D. Drug resistance mechanisms of *Mycoplasma pneumoniae* to macrolide antibiotics. *BioMed research international*. 2014;2014:320801.
156. Matsuoka M, Narita M, Okazaki N, Ohya H, Yamazaki T, Ouchi K, et al. Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(12):4624-30.
157. Peuchant O, Menard A, Renaudin H, Morozumi M, Ubukata K, Bebear CM, et al. Increased macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* in France directly detected in clinical specimens by real-time PCR and melting curve analysis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2009;64(1):52-8.
158. Wolff BJ, Thacker WL, Schwartz SB, Winchell JM. Detection of macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* by real-time PCR and high-resolution melt analysis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(10):3542-9.
159. Lin C, Li S, Sun H, Zhao H, Feng Y, Cao L, et al. Nested PCR-linked capillary electrophoresis and single-strand conformation polymorphisms for detection of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in Beijing, China. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48(12):4567-72.
160. Ji M, Lee NS, Oh JM, Jo JY, Choi EH, Yoo SJ, et al. Single-nucleotide polymorphism PCR for the detection of *Mycoplasma pneumoniae* and determination of macrolide resistance in respiratory samples. *Journal of microbiological methods*. 2014;102:32-6.
161. Ishiguro N, Sato R, Mori T, Tanaka H, Narita M, Nagano T, et al. Point-of-care molecular diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* including macrolide sensitivity using quenching probe polymerase chain reaction. *PLoS one*. 2021;16(10):e0258694.

162. Wagner K, Imkamp F, Pires VP, Keller PM. Evaluation of Lightmix Mycoplasma macrolide assay for detection of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in pneumonia patients. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2019;25(3):383 e5- e7.
163. Alós J-I. Quinolonas. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2009;27(5):290-7.
164. Hamasuna R, Le PT, Kutsuna S, Furubayashi K, Matsumoto M, Ohmagari N, et al. Mutations in *parC* and *gyrA* of moxifloxacin-resistant and susceptible *Mycoplasma genitalium* strains. *PloS one*. 2018;13(6):e0198355.
165. Deguchi T, Maeda S, Tamaki M, Yoshida T, Ishiko H, Ito M, et al. Analysis of the *gyrA* and *parC* genes of *Mycoplasma genitalium* detected in first-pass urine of men with non-gonococcal urethritis before and after fluoroquinolone treatment. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2001;48(5):742-4.
166. Tagg KA, Jeffreys NJ, Couldwell DL, Donald JA, Gilbert GL. Fluoroquinolone and macrolide resistance-associated mutations in *Mycoplasma genitalium*. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(7):2245-9.
167. Couldwell DL, Tagg KA, Jeffreys NJ, Gilbert GL. Failure of moxifloxacin treatment in *Mycoplasma genitalium* infections due to macrolide and fluoroquinolone resistance. *International journal of STD & AIDS*. 2013;24(10):822-8.
168. Pond MJ, Nori AV, Witney AA, Lopeman RC, Butcher PD, Sadiq ST. High prevalence of antibiotic-resistant *Mycoplasma genitalium* in nongonococcal urethritis: the need for routine testing and the inadequacy of current treatment options. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2014;58(5):631-7.
169. Le Roy C, Henin N, Pereyre S, Bebear C. Fluoroquinolone-Resistant *Mycoplasma genitalium*, Southwestern France. *Emerging infectious diseases*. 2016;22(9):1677-9.
170. Tickner JA, Bradshaw CS, Murray GL, Whiley DM, Sweeney EL. Novel probe-based melting curve assays for the characterization of fluoroquinolone resistance in *Mycoplasma genitalium*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2022;77(6):1592-9.
171. Fernandez-Huerta M, Bodiyaadu K, Esperalba J, Bradshaw CS, Serra-Pladevall J, Garland SM, et al. Multicenter clinical evaluation of a novel multiplex real-time PCR (qPCR) assay for detection of fluoroquinolone resistance in *Mycoplasma genitalium*. *Journal of clinical microbiology*. 2019.
172. Sweeney EL, Lowry K, Ebeyan S, Lundgren M, Whiley DM. Evaluation of the Speedx MG *parC* (Beta) PCR Assay for Rapid Detection of *Mycoplasma genitalium* Quinolone Resistance-Associated Mutations. *Journal of clinical microbiology*. 2020;58(10).

173. Bodiya K, Danielewski J, Garland SM, Machalek DA, Bradshaw CS, Birnie J, et al. Detection of *parC* gene mutations associated with quinolone resistance in *Mycoplasma genitalium*: evaluation of a multiplex real-time PCR assay. *Journal of medical microbiology*. 2021;70(3).
174. Allplex™ MG & MoxiR Assay. Disponible en: https://www.seegene.com/assays/allplex_mg_n_moxir_assay#. Last accessed on June 9th 2022.
175. Melamede RJ. Automatable process for sequencing nucleotide. United States; US4863849A. 1989.
176. Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*. 1998;281(5375):363, 5.
177. Ahmadian A, Ehn M, Hober S. Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clinica chimica acta*. 2006;363(1):83-94.
178. Le Roy C, Bebear C, Pereyre S. Performance of Three Commercial Molecular Diagnostic Assays for the Simultaneous Detection of *Mycoplasma genitalium* and Macrolide Resistance. *Journal of clinical microbiology*. 2021;59(6).
179. Le Roy C, Henin N, Bebear C, Pereyre S. Evaluation of a Commercial Multiplex Quantitative PCR (qPCR) Assay for Simultaneous Detection of *Mycoplasma genitalium* and Macrolide Resistance-Associated Mutations in Clinical Specimens. *Journal of clinical microbiology*. 2017;55(3):978-9.
180. Le Roy C, Pereyre S, Henin N, Bebear C. French Prospective Clinical Evaluation of the Aptima *Mycoplasma genitalium* CE-IVD Assay and Macrolide Resistance Detection Using Three Distinct Assays. *Journal of clinical microbiology*. 2017;55(11):3194-200.
181. Fernandez-Huerta M, Salmeron P, Silgado A, Espasa M, Pumarola T, Tulsiani-Drud S, et al. Clinical evaluation of the ResistancePlus MG Flex test on the GeneXpert Infinity-48s instrument: a near-patient assay for simultaneous detection of *Mycoplasma genitalium* and macrolide resistance. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2020;97(4):115062.
182. Le Roy C, Bebear C, Pereyre S. Clinical Evaluation of Three Commercial PCR Assays for the Detection of Macrolide Resistance in *Mycoplasma genitalium*. *Journal of clinical microbiology*. 2020;58(2).
183. Li X, Atkinson TP, Hagood J, Makris C, Duffy LB, Waites KB. Emerging macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* in children: detection and characterization of resistant isolates. *The Pediatric infectious disease journal*. 2009;28(8):693-6.
184. Yoo SJ, Kim HB, Choi SH, Lee SO, Kim SH, Hong SB, et al. Differences in the frequency of 23S rRNA gene mutations in *Mycoplasma pneumoniae* between children and

- adults with community-acquired pneumonia: clinical impact of mutations conferring macrolide resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(12):6393-6.
185. Spuesens EB, Hoogenboezem T, Sluijter M, Hartwig NG, van Rossum AM, Vink C. Macrolide resistance determination and molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* by pyrosequencing. *Journal of microbiological methods*. 2010;82(3):214-22.
186. Spuesens EB, Meijer A, Bierschenk D, Hoogenboezem T, Donker GA, Hartwig NG, et al. Macrolide resistance determination and molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory specimens collected between 1997 and 2008 in The Netherlands. *Journal of clinical microbiology*. 2012;50(6):1999-2004.
187. Chan KH, To KK, Chan BW, Li CP, Chiu SS, Yuen KY, et al. Comparison of pyrosequencing, Sanger sequencing, and melting curve analysis for detection of low-frequency macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* quasispecies in respiratory specimens. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(8):2592-8.
188. Meyer Sauter PM, Bleisch B, Voit A, Maurer FP, Rely C, Berger C, et al. Survey of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in children with community-acquired pneumonia in Switzerland. *Swiss medical weekly*. 2014;144:w14041.
189. Talkington DF, Shott S, Fallon MT, Schwartz SB, Thacker WL. Analysis of eight commercial enzyme immunoassay tests for detection of antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* in human serum. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2004;11(5):862-7.
190. Nilsson AC, Bjorkman P, Persson K. Polymerase chain reaction is superior to serology for the diagnosis of acute *Mycoplasma pneumoniae* infection and reveals a high rate of persistent infection. *BMC Microbiol*. 2008;8:93.
191. Copete AR, Vera C, Herrera M, Aguilar YA, Rueda ZV, Velez LA. *Mycoplasma pneumoniae* in Children With and Without Community-acquired Pneumonia. What do PCR and Serology Say? *The Pediatric infectious disease journal*. 2020;39(7):e104-e8.
192. Wang L, Feng Z, Zhao M, Yang S, Yan X, Guo W, et al. A comparison study between GeXP-based multiplex-PCR and serology assay for *Mycoplasma pneumoniae* detection in children with community acquired pneumonia. *BMC infectious diseases*. 2017;17(1):518.
193. Meyer Sauter PM, Krautter S, Ambroggio L, Seiler M, Paioni P, Rely C, et al. Improved Diagnostics Help to Identify Clinical Features and Biomarkers That Predict *Mycoplasma pneumoniae* Community-acquired Pneumonia in Children. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2020;71(7):1645-54.
194. Kim NH, Lee JA, Eun BW, Shin SH, Chung EH, Park KW, et al. Comparison of polymerase chain reaction and the indirect particle agglutination antibody test for the

diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children during two outbreaks. The Pediatric infectious disease journal. 2007;26(10):897-903.

195. Benitez AJ, Diaz MH, Wolff BJ, Pimentel G, Njenga MK, Estevez A, et al. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis of *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates from 1962 to the present: a retrospective study. Journal of clinical microbiology. 2012;50(11):3620-6.

196. Kogoj R, Praprotnik M, Mrvic T, Korva M, Kese D. Genetic diversity and macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* isolates from two consecutive epidemics in Slovenia. European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2018;37(1):99-107.

197. Pereyre S, Charron A, Hidalgo-Grass C, Touati A, Moses AE, Nir-Paz R, et al. The spread of *Mycoplasma pneumoniae* is polyclonal in both an endemic setting in France and in an epidemic setting in Israel. PloS one. 2012;7(6):e38585.

198. Zhao F, Li J, Liu J, Guan X, Gong J, Liu L, et al. Antimicrobial susceptibility and molecular characteristics of *Mycoplasma pneumoniae* isolates across different regions of China. Antimicrobial resistance and infection control. 2019;8:143.

199. Sun H, Xue G, Yan C, Li S, Cao L, Yuan Y, et al. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis of *Mycoplasma pneumoniae* clinical specimens and proposal for amendment of MLVA nomenclature. PloS one. 2013;8(5):e64607.

200. Yan C, Xue G, Zhao H, Feng Y, Li S, Cui J, et al. Molecular and clinical characteristics of severe *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children. Pediatric pulmonology. 2019;54(7):1012-21.

201. El Kholy AA, Mostafa NA, Ali AA, Soliman MM, El-Sherbini SA, Ismail RI, et al. The use of multiplex PCR for the diagnosis of viral severe acute respiratory infection in children: a high rate of co-detection during the winter season. European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2016;35(10):1607-13.

202. Moreno-Perez D, Andres Martin A, Tagarro Garcia A, Escribano Montaner A, Figuerola Mulet J, Garcia Garcia JJ, et al. [Community acquired pneumonia in children: Outpatient treatment and prevention]. An Pediatr (Barc). 2015;83(6):439 e1-7.

203. Lee H, Yun KW, Lee HJ, Choi EH. Antimicrobial therapy of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children. Expert Rev Anti Infect Ther. 2018;16(1):23-34.

204. Bebear C, Pereyre S, Peuchant O. *Mycoplasma pneumoniae*: susceptibility and resistance to antibiotics. Future microbiology. 2011;6(4):423-31.

205. Zhou Z, Li X, Chen X, Luo F, Pan C, Zheng X, et al. Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in adults in Zhejiang, China. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(2):1048-51.
206. Liu Y, Ye X, Zhang H, Xu X, Li W, Zhu D, et al. Characterization of macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* isolated from children in Shanghai, China. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2010;67(4):355-8.
207. Zhao F, Liu G, Wu J, Cao B, Tao X, He L, et al. Surveillance of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in Beijing, China, from 2008 to 2012. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(3):1521-3.
208. Ho PL, Law PY, Chan BW, Wong CW, To KK, Chiu SS, et al. 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. *Journal of clinical microbiology*. 2015;53(11):3560-4.
209. Zhao F, Liu J, Shi W, Huang F, Liu L, Zhao S, et al. Antimicrobial susceptibility and genotyping of *Mycoplasma pneumoniae* isolates in Beijing, China, from 2014 to 2016. *Antimicrobial resistance and infection control*. 2019;8:18.
210. Matsuda K, Narita M, Sera N, Maeda E, Yoshitomi H, Ohya H, et al. Gene and cytokine profile analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* infection in Fukuoka, Japan. *BMC infectious diseases*. 2013;13:591.
211. Tanaka T, Oishi T, Miyata I, Wakabayashi S, Kono M, Ono S, et al. Macrolide-Resistant *Mycoplasma pneumoniae* Infection, Japan, 2008-2015. *Emerging infectious diseases*. 2017;23(10):1703-6.
212. Okada T, Morozumi M, Tajima T, Hasegawa M, Sakata H, Ohnari S, et al. Rapid effectiveness of minocycline or doxycycline against macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* infection in a 2011 outbreak among Japanese children. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2012;55(12):1642-9.
213. Dumke R, von Baum H, Luck PC, Jacobs E. Occurrence of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains in Germany. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2010;16(6):613-6.
214. Gullsbj K, Bondeson K. No detection of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* from Swedish patients, 1996-2013. *Infection ecology & epidemiology*. 2016;6:31374.

215. Jensen JS. *Mycoplasma genitalium*: the aetiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV. 2004;18(1):1-11.
216. Lau A, Bradshaw CS, Lewis D, Fairley CK, Chen MY, Kong FY, et al. The Efficacy of Azithromycin for the Treatment of Genital *Mycoplasma genitalium*: A Systematic Review and Meta-analysis. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2015;61(9):1389-99.
217. Li Y, Le WJ, Li S, Cao YP, Su XH. Meta-analysis of the efficacy of moxifloxacin in treating *Mycoplasma genitalium* infection. International journal of STD & AIDS. 2017;28(11):1106-14.
218. Jensen JS. Protocol for the detection of *Mycoplasma genitalium* by PCR from clinical specimens and subsequent detection of macrolide resistance-mediating mutations in region V of the 23S rRNA gene. Methods Mol Biol. 2012;903:129-39.
219. Touati A, Peuchant O, Jensen JS, Bebear C, Pereyre S. Direct detection of macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium* isolates from clinical specimens from France by use of real-time PCR and melting curve analysis. Journal of clinical microbiology. 2014;52(5):1549-55.
220. Lopez-Corbeto E, Gonzalez V, Casabona J, Grupo de estudio CN-A. Prevalence and re-infection rate of *C. trachomatis* genital infections in young people under 25 years in Catalonia. Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica. 2017;35(6):359-63.
221. Fernandez G, Martro E, Gonzalez V, Saludes V, Bascunana E, Marco C, et al. Usefulness of a novel multiplex real-time PCR assay for the diagnosis of sexually-transmitted infections. Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica. 2016;34(8):471-6.
222. Cina M, Baumann L, Egli-Gany D, Halbeisen FS, Ali H, Scott P, et al. *Mycoplasma genitalium* incidence, persistence, concordance between partners and progression: systematic review and meta-analysis. Sexually transmitted infections. 2019;95(5):328-35.
223. Vazquez F, Fernandez J. Resistance-Guided Therapy for *Mycoplasma genitalium* Infections. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2020;71(6):1469-71.
224. Horner P, Donders G, Cusini M, Gomberg M, Jensen JS, Unemo M. 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. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV. 2018;32(11):1845-51.

225. Asenjo A, Kusters JG, Severs TT, Alos JI. *Mycoplasma genitalium* in Spain: prevalence of genital infection and frequency of resistance to macrolides. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)*. 2018;36(3):169-71.
226. Trevino M, Rodriguez-Velasco M, Manso T, Cea M. *Mycoplasma genitalium* in Primary Care: Prevalence and azithromycin resistance in Santiago de Compostela Health Care Area. *Rev Esp Quimioter*. 2021.
227. Adelantado Lacasa M, Beristain X. Prevalence of *Mycoplasma genitalium* infection and antibiotic resistance in Navarra (North Spain). *Sexually transmitted infections*. 2019;95(7):549.
228. Pineiro L, Idigoras P, de la Caba I, Lopez-Olaizola M, Cilla G. Guided antibiotic therapy for *Mycoplasma genitalium* infections: Analysis of mutations associated with resistance to macrolides and fluoroquinolones. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*. 2019;37(6):394-7.
229. de Salazar A, Barrientos-Duran A, Espadafor B, Fuentes-Lopez A, Chueca N, Garcia F. Macrolide and fluoroquinolone resistance of *Mycoplasma genitalium* in southern Spain, 2018-2019. *Sexually transmitted infections*. 2021;97(1):8-10.
230. Munoz Santa A, Aramburu Arnuelos J, Bernet Sanchez A, Belles Belles A. *Mycoplasma genitalium*: Analysis of mutations associated with macrolide resistance in Lleida, Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)*. 2021.
231. Fernandez-Huerta M, Vall M, Fernandez-Naval C, Barbera MJ, Arando M, Lopez L, et al. *Mycoplasma genitalium* macrolide resistance update: Rate among a 2016-2017 cohort of patients in Barcelona, Spain. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*. 2019.
232. Barbera MJ, Fernandez-Huerta M, Jensen JS, Caballero E, Andreu A. *Mycoplasma genitalium* Macrolide and Fluoroquinolone Resistance: Prevalence and Risk Factors Among a 2013-2014 Cohort of Patients in Barcelona, Spain. *Sexually transmitted diseases*. 2017;44(8):457-62.
233. Dionne-Odom J, Geisler WM, Aaron KJ, Waites KB, Westfall AO, Van Der Pol B, et al. High Prevalence of Multidrug-Resistant *Mycoplasma genitalium* in Human Immunodeficiency Virus-Infected Men Who Have Sex With Men in Alabama. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2018;66(5):796-8.




6. Anexos

6.1. Comunicaciones en congresos

MOLECULAR TYPING OF *Mycoplasma pneumoniae* WITH MULTI-LOCUS VARIABLE-NUMBER TANDEM-REPEAT FROM RESPIRATORY SPECIMENS IN A SPANISH HOSPITAL

Elena Jordana-Lluich^{1,2}, Belén Rivaya¹, Elisabet Bascañana¹, Sònia Molinos¹, Gema Fernández¹, Lurdes Matas^{1,3}, Vicente Ausina^{1,2,*}

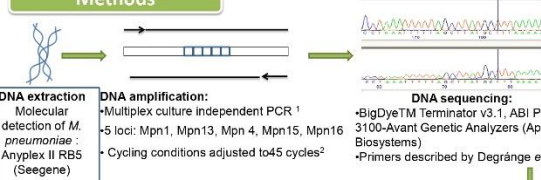
¹ Microbiology Service, University Hospital "Germans Trias i Pujol", Department of Genetics and Microbiology, Autonomous University of Barcelona, Badalona, Spain, ² CIBER in Respiratory Diseases (CIBERES), Madrid, Spain, ³ CIBER in Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Madrid, Spain

Background and objectives

Mycoplasma pneumoniae is a primary pathogen that can survive for a prolonged period of time in the respiratory tract of infected patients. As the epidemiological consequences of that fact are not known, it would be desirable to have a molecular tool for epidemiological surveillance purposes. The goal of this study was to establish the multi-locus variable-number tandem-repeat (MLVA) methodology in our setting, which has been previously described to have highly discriminatory power for genotyping.

Methods



DNA extraction: Molecular detection of *M. pneumoniae*: Anyplex II RB5 (Seegene)

DNA amplification: - Multiplex culture independent PCR¹
- 5 loci: Mpn1, Mpn13, Mpn4, Mpn15, Mpn16
- Cycling conditions adjusted to 45 cycles²

DNA sequencing: - BigDye™ Terminator v3.1, ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzers (Applied Biosystems)
- Primers described by Dégrange *et al.*³

MLVA analysis: - Repetition counts for each region determined using Tandem Repeat Finder

Indices	Repeat Size	Copy Number	Consensus Size	Percent Matches
256-292	12	3.7	12	100

CONCLUSIONS

- The MLVA is a highly discriminative technique for genotyping.
- The MLVA type most frequently detected was P (4/4/5/7/2) or 4/5/7/2, for the amended classification, in concordance with the literature.
- Patterns different from the 26 MLVA types described by Dégrange have been found in this study, as well as in the literature.
- The genotypes should be named using the combination of the number of tandem repeats.
- It should be considered to amend the proposed method, not considering the locus Mp1 due to its high variability
- The TRF can be used for the repetitions count from sequences.
- However, it should be bear in mind that in some cases the algorithm is not able to find them and, thus they should be counted manually.

Results

MLVA type ¹	N	13/14/15/16 ³	N
A (1/4/5/7/2)	3	1/5/6/2	2
B (2/3/5/6/2)	1	3/5/6/2	3
C (2/3/6/6/2)	4	3/6/6/2	7
G (3/3/6/6/2)	3	4/5/5/2	1
O (4/3/6/6/2)	3	4/5/6/2	1
P (4/4/5/7/2)	8	4/5/7/2	16
S (5/3/5/6/2)	1	4/5/7/3	1
U (5/4/5/7/2)	1	4/6/7/2	1
X (6/4/5/7/2)	3		
Z (7/4/5/7/2)	1		
Not classified ²	4		
TOTAL	32	TOTAL	32

¹Classification described by Dégrange, *et al.*
²No described by Dégrange
³Amended MLVA classification

Locus MP1 → Highly variable

Amended MLVA type →
Based on 4 loci: Mp13, Mp14, Mp15, Mp16

TANDEM REPEATS FINDER

- User-friendly program for the repetitions count
- However, when no repeats are found, they should be counted **MANUALLY**,
- Specially when the % of identity between tandem repeats is not 100%.

Example:


Sequence: 49..17 R M325_13.0.2
Parameters: 2 3 5 80 10 50 500
Length: 303

This is table 1 of 1 (0 repeats found)

The locus Mp13 (83% of identity between repeats) of the reference strain M129 has 4 repeats (3.2, rounded up to 4).

For the locus Mp13 of the specimen M325, the TRF was not able to find any repeats

Comparing with the reference strain, the locus Mp13 of the specimen M325 has 2.2 repeats (rounded up to 3).



¹ Dumke R, *et al.* J Microbiol Methods, 2011; 86: 393-6
² Benitez AJ, *et al.* J Clin Microbiol, 2012; 50(11):3603-6
³ Dégrange S, *et al.* J Clin Microbiol, 2009; 47: 914-23

Copyright © 2016 *Correspondence to: Vicente Ausina, v.ausina.germanstias@gencat.cat

Germans Trias i Pujol Hospital
Institut Català de la Salut

Molecular diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* and macrolide resistance detection by pyrosequencing from respiratory specimens in a Spanish Hospital

Belén Rivaya¹, Gema Fernández¹, Elisabet Bascañana¹, Sònia Molinos¹, Victoria González^{1,2,3}, Elena Jordana-Lluch^{1,4}, Lurdes Matas^{1,2}, Vicente Ausina^{1,4,*}

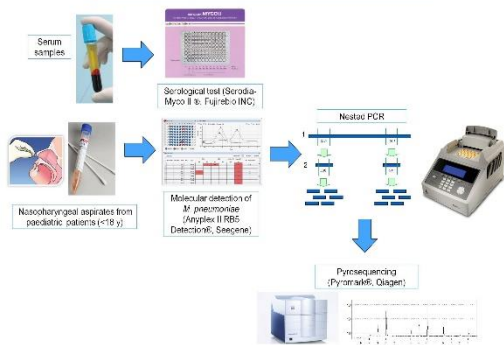
¹Microbiology Service, University Hospital "Germans Trias i Pujol", Department of Genetics and Microbiology, Autonomous University of Barcelona, Badalona, Spain, ²CIBER in Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Madrid, Spain, ³Centre for Epidemiological Studies on HIV/STI in Catalonia (CEEISCAT-ICO Badalona, Barcelona, Spain), ⁴CIBER in Respiratory Diseases (CIBERES), Madrid, Spain

BACKGROUND

Mycoplasma pneumoniae is a prevalent pathogen of the human respiratory tract that causes community acquired pneumonia and can survive for a prolonged period of time in the respiratory tract, with an unknown epidemiological consequence. Although serological testing is widely used as a diagnostic method, molecular techniques offer a rapid and reliable alternative. Macrolides (ML) are the first-line treatment. However, some ML-resistant genotypes have been described, with an increasing incidence fundamentally in Asia. This phenotype is given by several point mutations in domain V of the 23S rRNA gene:

High ML resistance profile	Low ML resistance profile
2063 A → T/G	2067 A → G
2064 A → C/G	2617 C → G/A

METHODS



© 2014 Rivaya et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

© 2014 Ausina et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

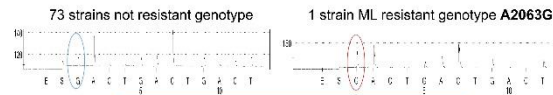
OBJECTIVES

1. Incorporate a molecular diagnosis technique as a complement of the serological testing
2. Evaluate the ML resistance in *M. pneumoniae* in our setting in comparison with the results described in other countries

RESULTS

	POSITIVE MOLECULAR DETECTION	NEGATIVE MOLECULAR DETECTION	TOTAL	STATISTICAL ANALYSIS	RESULTS
POSITIVE SEROLOGICAL RESULTS	50	32	82	SENSITIVITY	60.88%
NEGATIVE SEROLOGICAL RESULTS	10	54	64	SPECIFICITY	84.38%
				PREDICTIVE POSITIVE VALUE	83.33%
				PREDICTIVE NEGATIVE VALUE	62.79%
TOTAL	60	86	146		

The detection of ML resistance by pyrosequencing was performed in 74 samples, with the following results:



CONCLUSIONS

- ✓ Molecular methods used in combination with serological tests can improve the diagnostic of *M. pneumoniae*
- ✓ These methods may contribute to the understanding of its transmission and epidemiology
- ✓ Further studies are necessary to evaluate the ML resistance epidemiology in our country.

Germans Trias i Pujol Hospital
Institut Català de la Salut

UAB

Macrolide resistance detection in *M. pneumoniae* strains following a respiratory infection treatment

Belén Ríveda¹, Gema Fernández², Elisabet Bascuñana¹, Elena Jordana-Lluch^{1,3}, Sónia Molinos^{1,3}, Noelia López González¹, María Méndez¹, Lurdes Matas^{1,2}

¹Microbiology Service, University Hospital "Germans Trias i Pujol", Department of Genetics and Microbiology, Autonomous University of Barcelona, Badalona, Spain, ²CIBER in Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Madrid, Spain, ³CIBER in Respiratory Diseases (CIBERES), Madrid, Spain, ⁴Paediatric Department, University Hospital "Germans Trias i Pujol", Badalona, Spain

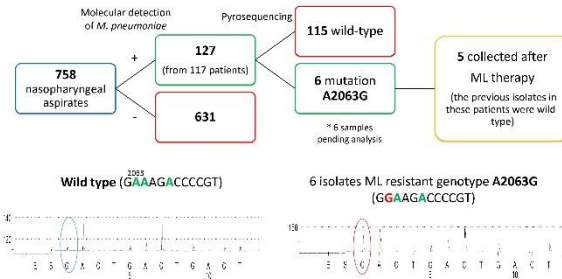
BACKGROUND

M. pneumoniae is a primary pathogen of the respiratory tract, causing community acquired pneumonia especially in the elderly and young people. In addition, it can survive for a prolonged period of time in the respiratory tract, with an unknown epidemiological consequence. Macrolides (ML) are the first-line treatment for this kind of infections. In recent years, the increasing incidence of ML resistant *M. pneumoniae* strains, has been reported worldwide, mainly in East-Asia, in contrast to our country. This phenotype is linked to the presence of punctual mutations caused by transitions or transversions in domain V of the 23S rRNA gene, at positions 2063, 2064, 2067 and 2617.

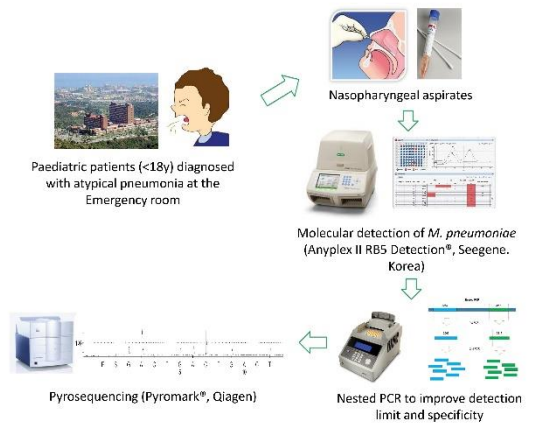
OBJECTIVES

- To test the presence of mutations associated to ML resistance in *M. pneumoniae* in our setting.
- To evaluate the influence of ML treatment in the induction of the resistant phenotype

RESULTS



METHODS



CONCLUSIONS

- ML resistant isolates of *M. pneumoniae* are 4.7% (6/127) in our area.
- A2063G is the most frequently detected mutation.
- Given that the 83.3% (5/6) of the resistant isolates were detected after a single ML treatment, and the pneumonia usually resolves spontaneously, the appropriateness of antibiotic treatment should be assessed in each particular case.

This work was supported by the 752779 project financed by the Spanish Ministerio de Sanidad y Consumo. The authors are grateful to the CIBER in Epidemiology and Public Health (CIBERESP) for their support.



Germans Trias i Pujol Hospital
Institut Català de la Salut

UAB
Universitat Autònoma de Barcelona

Epistemon 1884, n.º 4. CIBERESP, 2012. doi:10.1039/c2cp20004a

Copyright © 2015. Correspondence to: Lurdes Matas, lmatas.germans@ub.edu

Macrolide resistance detection and molecular typing of *M. pneumoniae* strains in a Spanish hospital

Belén Rivaya^{1,5}, Elena Jordana-Lluch^{1,†}, Gema Fernández¹, Elisabet Bascuñana¹, Sònia Molinos^{1,3}, Nona Roman¹, María Méndez¹, Lurdes Matas^{1,2}

¹Microbiology Service, University Hospital "Germans Trias i Pujol", Department of Genetics and Microbiology, Autonomous University of Barcelona, Badalona, Spain, ²CIBER in Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Madrid, Spain, ³CIBER in Respiratory Diseases (CIBERES), Madrid, Spain, ⁴Paediatric Department, University Hospital "Germans Trias i Pujol", Badalona, Spain, ⁵Institute for Health Science Research Germans Trias i Pujol (IGTP), [†]Current affiliation: Centre for Biomolecular Sciences, University of Nottingham, Nottingham, UK

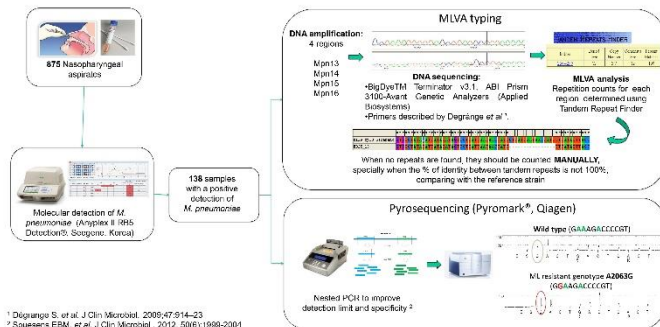
BACKGROUND

M. pneumoniae is a primary pathogen that can survive for a prolonged period of time in the respiratory tract of infected patients. In recent years, the increasing incidence of macrolide (ML) resistant *M. pneumoniae* strains has been reported worldwide, especially after the antibiotic treatment of the infection. ML resistance is linked to the presence of punctual mutations in domain V of the 23S rRNA gene, at positions 2063, 2064, 2067 and 2617. However, the epidemiological consequences in our area of those ML resistant strains are not known.

OBJECTIVES

- To test the presence of mutations associated to ML resistance in our setting.
- To genotype the strains using the MLVA methodology in order to understand its epidemiological distribution in our area.

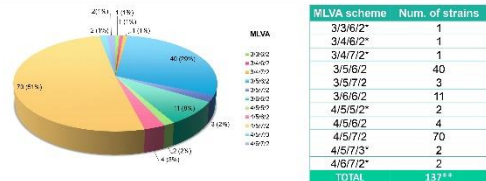
METHODS



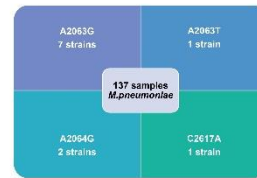
¹ Diguirane S, et al. J Clin Microbiol. 2006;47:814-23
² Squarini ESM, et al. J Clin Microbiol. 2012; 20(6):1999-2001

Copyright © 2017. All rights reserved. Lurdes Matas. Institut Germans Trias i Pujol

RESULTS



* No. described by Diguirane's scheme
 ** One sample did not empty due to low bacterial load



- 5 of them were detected from samples collected in the paediatric following-up after ML therapy.
- Previous strains from those patients collected during the pneumonia episode did not show any mutations.

CONCLUSIONS

- The increasing incidence of ML resistant *M. pneumoniae* strains was corroborated (detection of 10 resistant strains)
- A C2617A mutation was detected (typically reported in Asia).
- 5 of the mutations were found after the antibiotic treatment, *M. pneumoniae* pneumonia usually resolves spontaneously, so it should be reconsidered whether the treatment is suitable to all cases.
- MLVA is a highly discriminative genotyping technique that could allow us to better classify the strains.
- 4/5/7/2 and 3/5/6/2 are the most common genotypes in our area.
- Both techniques have proved to be valuable tools for the *M. pneumoniae* epidemiological studies in our area.



Macrolide resistance detection in *M. genitalium* by pyrosequencing in a Spanish Hospital

Belén Rivaya^{1,5}, Victoria González^{1,2,3}, Gema Fernández¹, Cristina Casañ¹, Àngels AVECILLA⁴, Carla Lecumberri⁴, Nona Romani¹, Lurdes Matas^{1,5}

¹ Microbiology Service, Clinical Laboratory North Metropolitan Area, Department of Genetics and Microbiology, Autonomous University of Barcelona, Badalona, Spain
² Center for Epidemiological Studies on STIs and AIDS in Catalonia, Public Health Agency of Catalonia, Spain.
³ CIBER in Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Madrid, Spain
⁴ Primary Care Service, ASSIR Badalona-Sant Adrià, Badalona, Spain
⁵ ESCMID Study Group for Mycoplasma Infections (ESGMI)

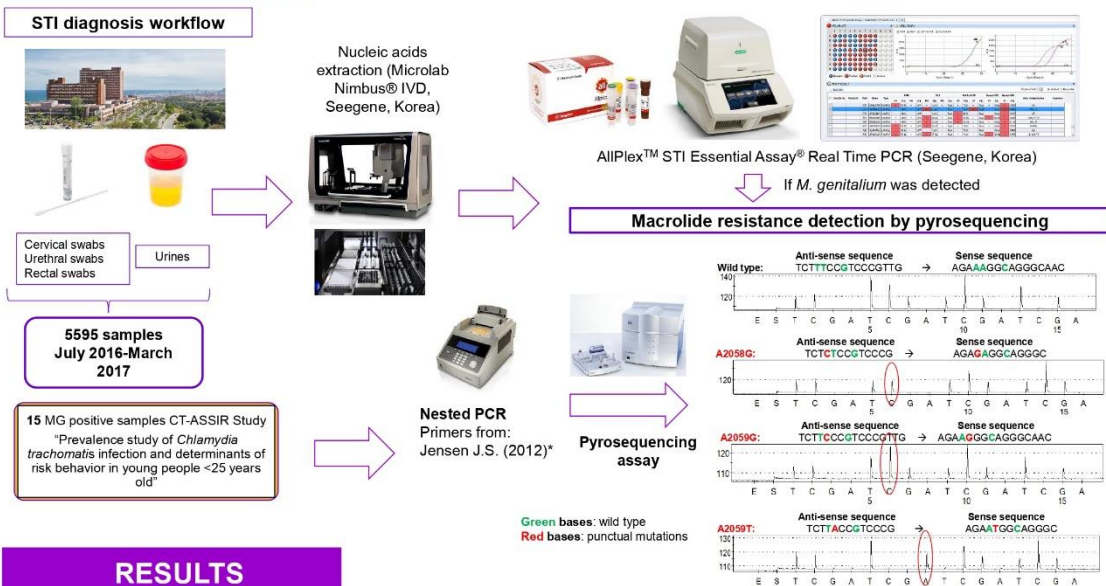
BACKGROUND and OBJECTIVES

Mycoplasma genitalium (MG) is a common cause of non-gonococcal urethritis and cervicitis. Macrolides (ML) are a first-line treatment, but resistant strains have been noted worldwide. Resistance is given by several point mutations in the V domain of the 23S rRNA, causing azithromycin failure or leading to resistance induction.

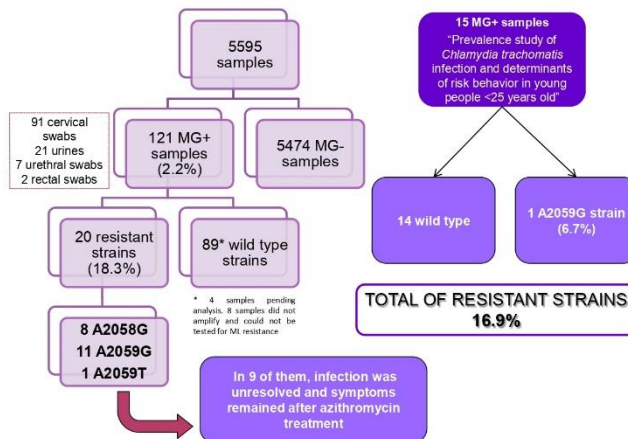
The goals of this study are:

1. To adapt a pyrosequencing technique previously used in *M. pneumoniae* (MP) to detect ML resistance in MG
2. To establish the current prevalence of resistant strains in our area.

METHODS



RESULTS



CONCLUSIONS

- ☞ Molecular methods allow MG detection, providing a diagnostic approach in cases which the usual pathogens are not isolated.
- ☞ Mutations associated with MLr are present in a high percentage of the strains tested (16.9%).
- ☞ This implies that recommended empirical treatment may not be effective in approximately 18% of infections, so the feasibility of modifying this antibiotic regimen should be assessed.

REFERENCES

*Jensen J.S. (2012). Protocol for the Detection of *Mycoplasma genitalium* by PCR from Clinical Specimens and Subsequent Detection of Macrolide Resistance-Associated Mutations in Region V of the 23S rRNA Gene. In: *Myxobolus C. Trachomatis* (Ed.). *Diagnosis of Sexually Transmitted Diseases. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol. 963. Humana Press, Tables.

Detección de mutaciones asociadas a resistencia a macrólidos en *Mycoplasma genitalium* por pirosecuenciación en el área Metropolitana Norte de Barcelona

Belén Rivaya^{1,5}, Victoria González^{1,3,4}, Gema Fernández¹, María Carrasco¹, Elisabet Bascuñana¹, Elisa Martró^{1,2,4}, Lurdes Matas^{1,4}

¹ Servicio de Microbiología, Laboratorio Clínico Metropolitana Nord, Departamento de Genética y Microbiología, Universidad Autónoma de Barcelona, Badalona.
² Instituto de Investigación Germans Trias i Pujol (IGTP), Badalona, España.
³ Centro de Estudios Epidemiológicos sobre las ITS-VIH/SIDA de Cataluña, Agencia de Salud Pública de Catalunya, Generalitat de Catalunya.
⁴ CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid.
⁵ ESCMID Study Group for Mycoplasma Infections (ESGMI)

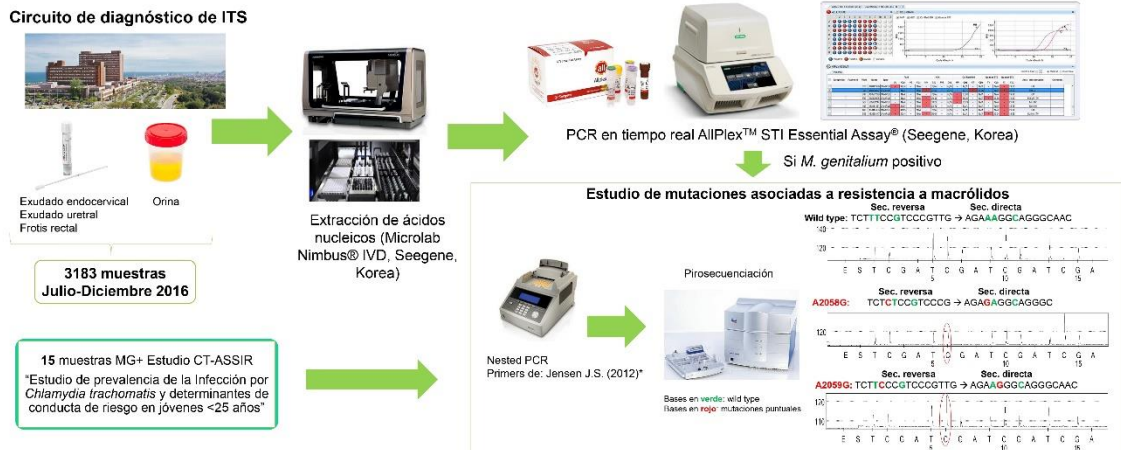
INTRODUCCIÓN

Mycoplasma genitalium (MG) es un patógeno de transmisión sexual causante de entre un 10-35% de cuadros de uretritis no gonocócica en hombres y asociado con cervicitis y enfermedad inflamatoria pélvica en mujeres. El diagnóstico de elección de las infecciones en MG es por métodos moleculares y el tratamiento de elección son los macrólidos (ML). Desafortunadamente, tal como se había descrito previamente en *M. pneumoniae* (MP), se han reportado cepas con mutaciones en el dominio V del 23S rRNA que confieren resistencia a ML. Este fenotipo viene dado por transiciones o transversiones puntuales en las posiciones nucleotídicas 2058, 2059 y 2062, que condicionan que el tratamiento con monodosis de 1g de azitromicina bien no sea efectivo o bien lleve a la inducción de resistencias.

Los **objetivos** de este estudio son:

1. Puesta a punto de una técnica de pirosecuenciación para detectar la presencia de mutaciones asociadas a resistencia a ML en MG
2. Establecer la prevalencia actual de cepas resistentes en nuestra área de influencia.

MATERIAL Y MÉTODOS



RESULTADOS



CONCLUSIONES

✓ Los métodos moleculares empleados proporcionan la detección de MG, permitiendo el abordaje diagnóstico de cuadros clínicos en los que no se aislaba ninguno de los patógenos habituales.

✓ Las mutaciones asociadas a resistencia a macrólidos están presentes en un elevado porcentaje de las cepas estudiadas (14.3%).

✓ Este elevado porcentaje implica que el tratamiento empírico recomendado actualmente (azitromicina 1g VO + ceftriaxona 250mg IM) podría no ser efectivo en aproximadamente un 15% de estas infecciones, por lo que debería valorarse la conveniencia de modificar esta pauta antibiótica.

BIBLIOGRAFIA

* Jensen J.S. (2012). Protocol for the detection of *Mycoplasma genitalium* by PCR from clinical specimens and subsequent detection of macrolide resistance. *Journal of Clinical Microbiology*. 50(12): 3661-3664. doi:10.1128/JCM.01011-11

Prevalencia de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium* y coinfecciones en gestantes ≤25 años en Cataluña

Victoria González Soler^{1,2,4}, Evelin López-Corbeto^{1,4}, Belén Rivaya Sánchez^{2,3}, Rossie Lugo Colón^{1,4}, Jordi Casabona Barbrà^{1,3,4}, Lurdes Matas Andreu^{2,3,4}, CT/NG Study Group⁵. ¹Centro de Estudios Epidemiológicos sobre las ITS/VIH/SIDA de Cataluña, Agència de Salut Pública de Catalunya, Generalitat de Catalunya. ²Servicio de Microbiología. Laboratori Clínic Metropolitana Nord. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Badalona, Barcelona. ³Universitat Autònoma de Barcelona. ⁴CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Barcelona. ⁵Centros de Atención a la Salud Sexual y Reproductiva (ASSIRS) de Cataluña.

Introducción:

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) continúan en aumento en nuestro entorno, especialmente la infección por *Chlamydia trachomatis* entre mujeres en edad reproductiva y jóvenes ≤25 años. Las ITS se han asociado a efectos adversos en el embarazo y neonato. Actualmente, Cataluña dispone de cribado prenatal universal de sífilis, VIH y hepatitis B y la incorporación en 2018 de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* según riesgo de la gestante. La comercialización de pruebas moleculares capaces de detectar varios microorganismos causantes de ITS en una sola muestra, brinda la oportunidad de valorar un diagnóstico precoz, minimizar el impacto y las secuelas en la salud materno-infantil. La prevalencia de infección por *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Mycoplasma genitalium* en mujeres embarazadas no está bien caracterizada en el grupo de gestantes jóvenes en nuestro medio.

Objetivos:

- Describir las características epidemiológicas de gestantes ≤25 años
- Determinar la prevalencia de infección genital por *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Mycoplasma genitalium*
- Medir la prevalencia de coinfección con los microorganismos detectados por una técnica de PCR Multiplex

Material y métodos: Estudio epidemiológico transversal en una muestra oportunistas de jóvenes entre 16-25 años, atendidos durante el 2016 en 24 centros de atención a la salud sexual y reproductiva y 3 centros de atención a los jóvenes de Cataluña. Se recogieron datos socio-demográficos, conductuales y clínicos de los últimos 12 meses mediante un cuestionario epidemiológico estandarizado y una muestra de orina. Las muestras de orina fueron analizadas en pools de 3 muestras utilizando la técnica de PCR multiplex (Anyplex™ II STI-7, Seegene). A partir de una muestra de 1032 jóvenes, se incluyeron un total de 81 embarazadas en el presente análisis. El análisis descriptivo y de estimación de prevalencia se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS v.19.

Resultados:

Del total de 81 gestantes, la edad media fue de 21,5 años con un 42,0% de origen extranjero. El 96,3% eran heterosexuales, con una edad promedio de debut sexual a los 16 años. Las características de conducta sexual declaradas durante el año previo al estudio fueron: tener una media de 2 parejas sexuales, relaciones simultáneas en el 3,7% de los casos, el 39,5% tuvo una interrupción voluntaria del embarazo y el 9,9% declararon haber tenido una ITS previa. Un 9,9% tuvo una nueva pareja sexual en los 3 meses previos al estudio. La prevalencia obtenida fue: 9,9% *Chlamydia trachomatis*, 2,5% *Neisseria gonorrhoeae* y 2,5% *Mycoplasma genitalium* (Figura 1). Del total de muestras positivas para las tres ITS de interés (n=10), el 50% presentó coinfección con otro microorganismo, siendo *Ureaplasma parvum* (80%) el microorganismo concomitante detectado con mayor frecuencia (Figura 2).

Fig. 1 Prevalencia ITS en gestantes

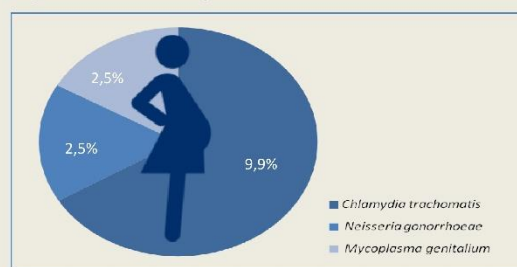
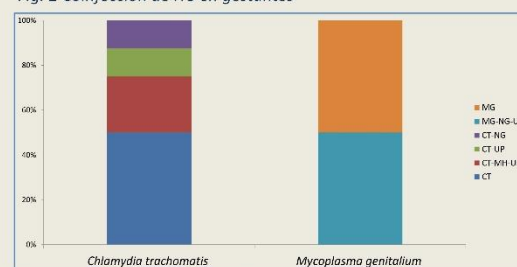


Fig. 2 Coinfección de ITS en gestantes



CT: *Chlamydia trachomatis*, NG: *Neisseria gonorrhoeae*, MG: *Mycoplasma genitalium*, MH: *Mycoplasma hominis*, UP: *Ureaplasma parvum*

Conclusiones:

- Por primera vez se evidencia en Cataluña una elevada prevalencia de *Chlamydia trachomatis* y coinfección con otros microorganismos, especialmente *Ureaplasma parvum* en gestantes ≤25 años.
- La limitación en el tamaño muestral y los datos encontrados, plantean la pertinencia de realizar un estudio para valorar el cribado y diagnóstico precoz de otras ITS en el seguimiento del embarazo.

Macrolide-resistant *M. genitalium* strains detected by pyrosequencing in a Spanish Hospital

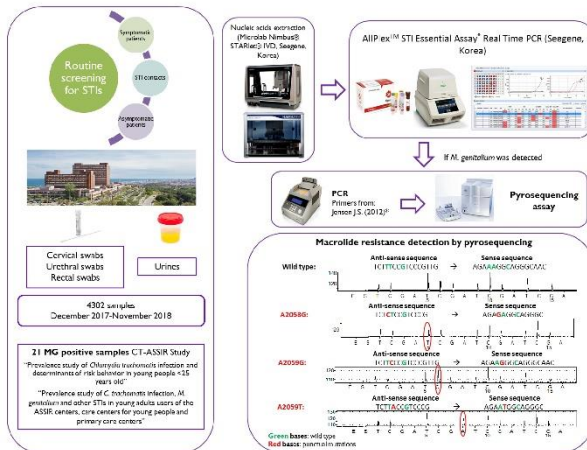
Belén Rivaya¹, Gema Fernández¹, Victoria González^{1,2,3}, Pep Coll¹, Montserrat Serra⁴, Teresa Gómez⁵, Maria Nadales⁶, Nona Romani¹, María Carrasco¹, Lurdes Matas^{1,3}
¹Microbiology Department, Laboratori Clínic Metropolitana Nord, University Hospital Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain; ²Center for Epidemiological Studies on STIs and AIDS in Catalonia, Public Health Agency of Catalonia, Spain; ³CIBER in Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Madrid, Spain; ⁴Obstetrics and Gynecology, University Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; ⁵Primary Care Service, ASSIR Manresa, Manresa, Spain; ⁶Primary Care Service, ASSIR Badalona-Sant Adrià, Badalona, Spain; ⁷AIDS Research Institute-IniCaixa, University Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

BACKGROUND and OBJECTIVES

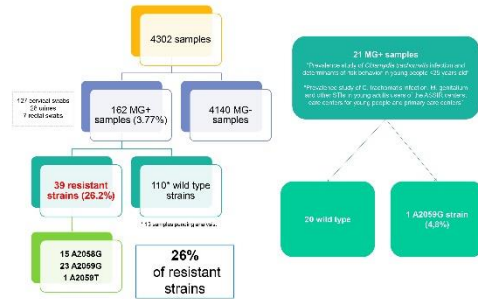
Mycoplasma genitalium (MG) is a common cause of non-gonococcal urethritis and cervicitis. Macrolides (ML) are a first-line treatment, but resistant patterns produced by several point mutations in 23S rRNA cause azithromycin failure or lead to resistance induction.

The goal of this study is to establish the current prevalence of resistant strains in our region using the pyrosequencing method for detection

METHODS



RESULTS



CONCLUSIONS

1. Molecular methods are fundamental to detecting MG infection, providing a diagnostic approach in cases in which the usual pathogens are not isolated.
2. Mutations associated with MLr are present in a high percentage of the strains tested (26% in the prospective study). This implies that recommended empirical treatment may not be effective in more than a quarter of infections.
3. Resistance tests should be performed following MG detection, in order to adjust antibiotic therapy in symptomatic infections.

© 2019, published by the Director of the Institute of Catalonian Health. All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or by any information storage or retrieval system, without the prior written permission of the Director of the Institute of Catalonian Health. Copyright © 2019. Contents not for sale. ISSN: 1699-5402. URL: www.gertrias.com

Macrolide resistance and clinical findings in *M. genitalium* in a Spanish university hospital

Belén Rivaya⁷, Gema Fernández⁷, Jun Hao Wang⁷, Angels Avella³, Rosa Diaz², Pep Coll⁶, Núria Grané⁴, Georgina Linares⁷, Victoria González^{1,2,7}, Lurdes Matas^{2,7}

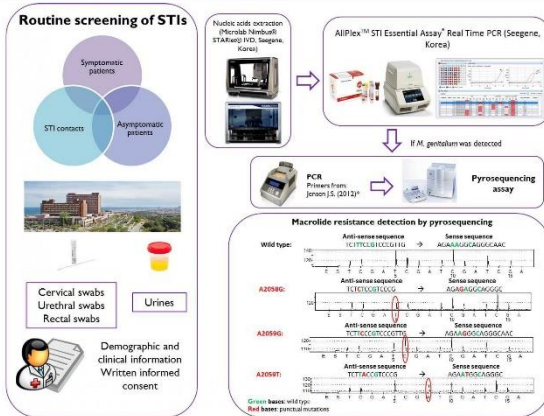
¹Center for Epidemiological Studies on STIs and AIDS in Catalonia, Public Health Agency of Catalonia, Spain; ²OBER in Epidemiology and Public Health (OBERENP), Madrid, Spain; ³Primary Care Service, ASSIR Badalona-Sant Adrià, Badalona, Spain; ⁴Obstetrics and Gynaecology, University Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; ⁵Primary Care Service, ASSIR Mataró, Mataró, Spain; ⁶AIDS Research Institute-InCaixa, University Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; ⁷Microbiology Department, Laboratori Clínic Metropolitana Nord, University Hospital Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain

BACKGROUND and OBJECTIVES

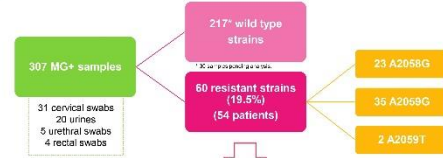
Mycoplasma genitalium (MG) has reached clinical importance in recent years as a remarkable etiological agent of non-gonococcal urethritis and cervicitis. Macrolides (ML) were first-line treatment but the emergence of ML resistant strains cause treatment failures or lead to resistance induction. In this context, 2016 European guideline on MG infections strongly recommended molecular detection of macrolide resistance-mediating mutation, testing that is not routinely performed in all laboratories.

The goal of this study is to establish the current prevalence of MG resistant strains in our region and to describe clinical and epidemiological characteristics in relation to MG detection.

METHODS



RESULTS



Variable		Number of patients (%)	Additional info
Gender	Women	27	
	Men	27	
Age (average, years)		29.9	
HIV	Women	0	
	Men	12 (44.4%)	MSM 8 (66.6%)
Symptoms	Asymptomatic	16 (29.6%)	
	Urethritis	11 (20.4%)	
	STI contact	4 (7.4%)	
	Proctitis	3 (5.5%)	
Coinfections	<i>C. trachomatis</i>	5	
	<i>N. gonorrhoeae</i>	1	
	<i>T. vaginalis</i> , <i>T. pallidum</i>	6	All cases HIV+
Previous ML treatment		9 (15%)	

CONCLUSIONS

1. Mutations associated with MLr are present in a high percentage of the strains tested (19.5%).
2. According to the current guidelines and the findings showed, resistance tests should be performed following MG detection, in order to adjust antibiotic therapy in symptomatic infections.

*Jones JS, et al. (2012) Detection of Mycoplasma genitalium by PCR using a novel primer set. J Clin Microbiol 50: 1000-1004.



Abstract Book 2020

European Congress of
Clinical Microbiology
and Infectious Diseases

ECCMID



www.eccmid.org
www.escmid.org

Abstract Categories 2020

- 3916 **Prevalence of *Mycoplasma genitalium* and macrolide resistance in Israel**
O. Treigerman* (Iod, Israel), G. Prajrod, D. Shasha
- 4229 **High prevalence of sexually-transmitted infections among at-risk HIV-positive patients**
K. Lin, H. Sun, Y. Chuang, U. Wu, W. Liu, T. Lee* (Taipei, Taiwan), S. Chang, Y. Chen, C. Hung
- 4262 **Reduced clinical improvement after treatment for urethritis in men with azithromycin resistant *Mycoplasma genitalium***
J. Braam* (Amsterdam, Netherlands), A. Van Dam, S. Bruisten, M. Van Der Loeff, M. Van Rooijen, H. De Vries, C. Vergunst
- 4314 **Experimental evolution of high-level azithromycin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* during morbidostat culture**
J. Laumen* (Antwerp, Belgium), S. Manoharan-Basil, E. Verhoeven, S. Abdellati, I. De Baetselier, T. Crucitti, B. Xavier, S. Chapelle, C. Lammens, C. Van Dijk, S. Malhotra-Kumar, C. Kenyon
- 4597 **Active search through multiplex PCR method for sexually-transmitted infections in patients with sterile pyuria**
H. Gil Campesino, L. Sante* (San Cristobal De La Laguna, Spain), M. Callejón Fernández, E. Callejas Castro, M. Lecuona
- 4606 **Comparison of ResistancePlus MG and pyrosequencing for macrolide resistance detection in *Mycoplasma genitalium* and evaluation of macrolide and fluoroquinolone resistance in Badalona, Spain**
B. Rivaya Sanchez* (Badalona, Spain), C. Le Roy, G. Fernández Rivas, C. Casan, V. González, L. Matas Andreu, C. Bébéar, S. Pereyre
- 4667 **Characterisation of *Neisseria gonorrhoeae* isolates using a core-genome multilocus sequence typing scheme**
P. Higgins* (Cologne, Germany), J. Wille, H. Seifert
- 4962 ***Mycoplasma genitalium* resistance against antibiotics in a Berlin MSM cohort tested with the Allplex MG & AzIR Assay and Allplex MG & MoxiR Assay**
M. Obermeier* (Berlin, Germany), S. Breuer, R. Ehret
- 4992 **Prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* at extragenital sites in the north metropolitan area in Catalonia**
C. Casan, G. Fernández Rivas, À. Hernández Rodríguez, M. Carrasco, G. Linares, B. Rivaya Sanchez* (Badalona, Spain), N. Romani Rodés, A. Fernández Navarro, L. Matas Andreu
- 5100 ***Haemophilus influenzae* as the causing pathogen of epididymo-orchitis: a case report**
T. Demuyser* (Brussels, Belgium), K. Vandoorslaer, S. Jacobs, L. Van Dijk, D. Pierard
- 5138 **Incidence and predictors of *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* in patients with sterile pyuria**
A. Aggarwal* (New Delhi, India), B. Dhawan, N. Wig, N. Vikram, M. Soneja, R. Chaudhry, A. Kapil
- 5441 **Microbiological features of vulvovaginitis in prepubescent girls**
M. Damala, A. Nikolakopoulou, C. Anthoulaki* (Athens, Greece), I. Koumpi, E. Prifti, L. Michala, N. Loukopoulou
- 5482 ***Neisseria gonorrhoeae* transcriptome analysis: profiling molecular determinants of resistance**
H. Machado, G. Toledo-Silva, J. Martins, M. Schörner, L. Golfetto, R. Mazzon, M. Bazzo* (Florianópolis, Brazil)
- 5616 ***Mycoplasma genitalium* infections can comprise mixtures of both quinolone-susceptible and quinolone-resistant strains**
E. Sweeney* (Herston, Australia), K. Lowry, C. Bletchly, G. Nimmo, D. Whiley
- 5863 **Association between the detection of human papilloma virus and pathogens causing sexually-transmitted infections in woman in reproductive period**
I. Hadji Petrusheva Melaska* (Skopje, Macedonia), K. Icev, A. Hadji-Petrusheva Jankijevikj
- 5918 **Epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial resistance and evaluation of alternative antibiotics**
J. Yan* (Hangzhou, China), S. Van Der Veen
- 6274 **Bacterial STI-testing in the private sector in France, 2006-2018**
D. Viriot* (Saint-Maurice, France), N. Ndeikoundam, E. Lucas, N. Dupin, B. De Barbeyrac, A. Bertolotti, C. Cazanave, S. Fouere, C. Pioche, F. Lot
- 6596 **Detection rates of bacterial vaginosis and sexually-transmitted pathogens associated with genital discharge syndrome in the South-African private sector**
C. Kingsburgh* (Pretoria, South Africa), K. Strydom, M. Kock
- 6602 **The natural history of gonorrhoea infection: an illustrative review**
J. Whelan* (Amsterdam, Netherlands), E. Beck
- 6696 **Epidemiology and treatment outcome of *Neisseria gonorrhoeae* infections**
J. Parkes-Smith, C. Palmer, A. Jennison, V. Hicks, L. Ariotti, S. Bell, D. Whiley, A. Walker, G. Playford, A. Henderson* (Brisbane, Australia)
- 6727 **Does trichomonas hurt? A five-year comprehensive full-region study**
M. Berends* (Groningen, Netherlands), D. Scoop, J. Weel, T. Schuurs
- 6875 **Is *Lactobacillus crispatus* a marker of cytolytic vaginosis in women under 45-years old?**
L. Fontan, A. Yarci Carrión, S. Gómez De Frutos, A. Fraile Torres, L. Cardeñosa* (Madrid, Spain), A. García
- 6878 **High prevalence of Lymphogranuloma venereum in men who have sex with men in Alicante, south-east Spain**
V. Ortiz-De La Tabla* (Alicante, Spain), G. Gázquez, A. Infante

Abstract 4606

Comparison of ResistancePlus MG and pyrosequencing for macrolide resistance detection in *Mycoplasma genitalium* and evaluation of macrolide and fluoroquinolone resistance in Badalona, Spain

Belen Rivaya Sanchez*¹, Chloé Le Roy², Gema Fernández Rivas^{1,3}, Cristina Casan¹, Victoria González^{1,4,5}, Lurdes Matas Andreu^{1,3,5}, Cécile Bébéar⁶, Sabine Pereyre⁷

¹Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Servei de Microbiologia. Laboratori Clínic Metropolitana Nord, Badalona, Spain, ²University of Bordeaux, Department of Bacteriology, Bordeaux, France, ³Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain, ⁴Centre d'Estudis Epidemiològics sobre el VIH/SIDA de Catalunya, Agència de Salut Pública de Catalunya, Generalitat de Catalunya, Badalona, Spain, ⁵CIBER in Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Madrid, Spain, ⁶CHU de Bordeaux and Univ. Bordeaux, Department of Bacteriology, National Reference Center for bacterial STIs, Bordeaux, France, ⁷CHU de Bordeaux and Univ. Bordeaux, Department of Bacteriology, National Reference Center for bacterial STIs, Bordeaux, France

Abstract third-party references: Ayuda de la SEIMC

Background: Macrolides are the first-line treatment for *Mycoplasma genitalium* (MG) infections, but resistant patterns have been described. Fluoroquinolones are the second-line therapy. Consequently, the 2016 European guideline has recommended studying macrolide resistance-associated mutations in all cases where MG is detected. Several commercial kits have been released lately. Our aim was to compare the clinical performance of the ResistancePlus MG kit (SpeeDx, Australia) with our in-house methods. Additionally, macrolide and fluoroquinolone resistance prevalence was determined.

Materials/methods: A total of 100 MG-positive samples, collected at the Hospital Germans Trias y Pujol, Badalona, Spain, and previously tested for MG by real-time PCR (Allplex[®] STI-7, Seegene) and pyrosequencing (Pyromark[®], Qiagen) to detect macrolide resistance were further analyzed using the one-step ResistancePlus MG kit (SpeeDx, Australia), and tested for fluoroquinolone resistance by *parC* gene Sanger sequencing at the University of Bordeaux, France.

Results: Regarding MG detection, an overall agreement of 87% was obtained comparing both methods. Thirteen samples were reported as negative by ResistancePlus MG but were detected with Allplex STI-7. Macrolide resistance prevalence was 64% in our hospital according to pyrosequencing. Among the 87 MG-positive samples detected using the ResistancePlus kit, 83 results were concordant with those obtained by pyrosequencing, showing an overall agreement of 95.4%. Three samples were reported as not mutated by the ResistancePlus kit but harbored a 23S rRNA A2058G (*E. coli* numbering) mutation by pyrosequencing, while the fourth sample was reported as mutated but was found wild-type by pyrosequencing.

Regarding fluoroquinolone resistance, 97 samples were wild-type for *parC* gene and 3 (3%) samples were resistant, harboring a S80I mutation (*E. coli* numbering). These three samples also harbored an A2059G macrolide resistance-associated mutation. Remarkably, one case corresponded to a second sample from a MG-positive patient that was initially found macrolide-resistant and fluoroquinolone-susceptible. After azithromycin and moxifloxacin treatment failures, the test-of-cure sample harbored both A2059G and S80I mutations.

Conclusions: The ResistancePlus MG SpeeDx is easy to use and showed a good correlation with pyrosequencing for mutation detection. Macrolide resistance is high in our area whereas fluoroquinolone resistance remains low. However, fluoroquinolone resistance should be studied in cases of moxifloxacin treatment failure.

Presenter email address: belenrivaya@gmail.com



6.2. Publicaciones adicionales

Artículo publicado en la revista del Col·legi de Biòlegs de Catalunya, Volumen 26, Julio 2016, páginas 6-10.



Mycoplasma pneumoniae



D'esquerra a dreta:

Belén Rivaya

Llicenciada en Farmàcia. Especialista en Microbiologia i Parasitologia

Elena Jordana

Llicenciada en Biologia. Doctora en Microbiologia

Elisabet Bascuñana

Tècnica Superior de Laboratori de Diagnòstic Clínic

Les tres treballen en el Servei de Microbiologia i Parasitologia de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol

EPIDEMIOLOGIA

Mycoplasma pneumoniae és un patògen primari exclusivament humà i de distribució universal que causa infecció respiratòria en individus de totes les edats. Es considera que és el responsable del 15-20% de les pneumònies adquirides a la comunitat i el segon agent causal d'infeccions de les vies respiratòries altes per darrera del virus Influenza.

Les infeccions es presenten en cicles epidèmics cada 3-5 anys, es donen durant tot l'any, però predominantment a l'estiu i a la tardor. La transmissió del bacteri es produeix de persona a persona, principalment en nens i adolescents i per via aèria en forma d'aerosols. Atès que és un microorganisme que presenta una gran sensibilitat als canvis de temperatura i humitat, es requereix una exposició intensa amb contacte íntim. Això explica el seu paper com a productor de brots en escoles, institucions o intrafamiliars.

Per una altra banda, s'ha demostrat que pot persistir durant un temps variable a la mucosa nasofaríngia després de la resolució del quadre clínic. Alguns estudis plantegen la possibilitat de que els pacients es comportin com a portadors asimptomàtics, facilitant així la transmissió del microorganisme.

La incidència de la infecció respiratòria és variable, depenent fonamentalment de l'edat de l'individu, de tal manera que els nens de menys d'un any d'edat són els que fan més infeccions asimptomàtiques, el grup de nens de 3-5 anys el que fan més malaltia, i al mig de ambdós grups es troben els nens de 6-12 anys. També s'ha observat que en nens menors de 3 anys la infecció respiratòria afecta principalment al tracte respiratori superior i entre els 5-20 anys són més freqüents els casos de bronquitis i pneumònia, encara que tots els grups d'edat són susceptibles. En adults la pneumònia és el quadre més comú.

PATOGENIA I IMMUNITAT

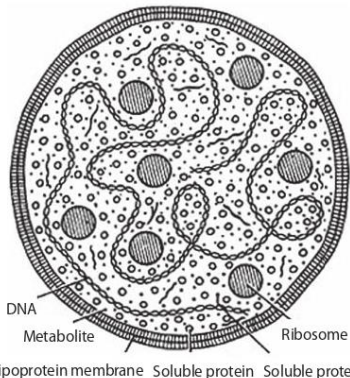
La citoaderència a l'epiteli ciliat bronquial de l'hoste, es considera el principal factor de virulència i el pas essencial per l'inici del procés infecciós. Dos minuts després de la inhalació, i gràcies al seu moviment per reptació sobre les superfícies, el micoplasma arriba a les cèl·lules ciliades del tracte respiratori, i procedeix a adherir-s'hi. Aquesta unió es realitza mitjançant un orgànul amb forma de punxa, format per un conjunt de proteïnes i adhesines, sent la proteïna P1 la més important. Sense aquesta proteïna el microorganisme

Mycoplasma pneumoniae és l'espècie humana més coneguda i més estudiada de tots els micoplasmes existents. És una de les principals causes de la pneumònia adquirida en la comunitat. El terme micoplasma va sorgir en la dècada de 1950 i significa "mykes" (fong) i "plasma" (format) en grec. Es va aïllar per primera vegada per Eaton et al. (1944) en cultiu de teixits de l'esput d'un pacient amb pneumònia atípica primària, pel que també és conegut com agent d'Eaton. No obstant això, fins a la dècada de 1960, no s'identifica clarament com un bacteri. És un patògen extracel·lular que pertany a la família Mycoplasmataceae de la classe Mollicutes, que es caracteritza principalment per la carència de paret cel·lular i per ser el microorganisme més petit de vida lliure, fet que li permet travessar els porus de 0.45 µm dels filtres (a diferència de la resta de bacteris). La classe Mollicutes ha evolucionat a partir de cèl·lules de tipus *Clostridium*, mitjançant successives deleccions genètiques, fins les cèl·lules actuals que presenten requeriments nutricionals específics i tenen una mida menor que la majoria de bacteris. El seu genoma és un dels més petits que es coneixen (consta de 816.394 bp i 687 gens codificadors de proteïnes) i per això, disposa d'una escassa dotació de vies metabòliques que el fan ser totalment dependent de la aportació exògena. Presenta una íntima relació microorganisme-hoste, que es manifesta com parasitisme de superfície amb les cèl·lules dels epitelis del tracte respiratori i cèl·lules del sistema immuni-

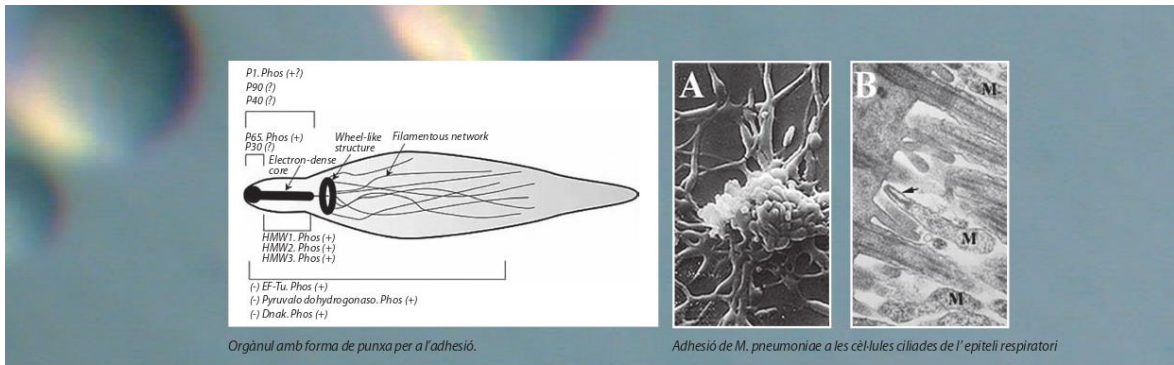
tari. Al contrari que els virus, els micoplasmes creixen en medis acel·lulars, contenen ARN i ADN i es divideixen per fissió binària. Moltes de les característiques de *M. pneumoniae* són degudes a l'absència de paret cel·lular (tenen una membrana plasmàtica trilaminar formada per proteïnes, lípids i esterols), com ara la resistència intrínseca als antibiòtics β-lactàmics (penicil·lines, cefalosporines, carbapenems) i glicopèptids (vancomicina), que no es puguin tenyir mitjançant la tinció de Gram, i la seva elevada sensibilitat als canvis de tensió osmòtica, pH i temperatura i presència de detergents. També presenten una gran plasticitat cel·lular, ja que la membrana trilaminar, li permet adoptar diferents formes (polimorfisme): coccoide, cocobacilar, filamentosa i/o estelada. *M. pneumoniae* és un patògen molt exigent que pot créixer en medis de cultiu, però presenta requeriments nutricionals complexos (sèrum de cavall, glucosa i extracte de llevat fresc). El seu creixement és lent (6-7 dies, arribant en alguns casos als 20 dies) per la qual cosa, el diagnòstic de les infeccions per *M. pneumoniae* es realitza tradicionalment mitjançant tècniques serològiques. En els cultius amb medi líquid micoplasma no enterboleix el medi i en medi sòlid amb agar dona lloc a colònies petites, groguenques, esfèriques i granuloses incloses en el medi i amb una capa externa molt prima. Es necessari recorre al microscopi estereoscòpic per observar les seves colònies en forma de móra.

perdria la seva adhesivitat i per tant, la seva capacitat patògena. Una vegada establerta la unió entre el micoplasma i les cèl·lules de l'epiteli, el bacteri secreta i introdueix a la cèl·lula peròxid d'hidrogen, anió superòxid i la "Toxina de la Síndrome d'Insuficiència Respiratòria Adquirida a la Comunitat" (toxina CARDS). Aquesta toxina CARDS, es va descobrir a l'any 2006 i és un potent inductor de la inflamació exagerada i prolongada, que provoca dany tissular, estrenyiment de les vies respiratòries, hipersecreció de moc, sibilàncies i tos. Els efectes citopàtics causats per l'alliberació d'aquests productes metabòlics tòxics són la pèrdua de l'activitat dels cilis i la destrucció final del conjunt de cèl·lules de la capa epitelial. La resposta inflamatòria local es causada per les lipoproteïnes de la membrana cel·lular de *M. pneumoniae* que activen i indueixen de forma directa la producció de citocines a partir dels leucòcits de sang perifèrica, cèl·lules epitelials respiratòries, monòcits, macròfags i pneumòcits tipus II dels alvèols pulmonars, formant un infiltrat cel·lular inflamatori peribronquial i perivascular. Dintre de l'infiltrat limfocitari, els micoplasmes oposonitzats pel complement i els anticossos són posteriorment fagocitats pels macròfags activats, limitant el creixement del microorganisme.

Mycoplasma pneumoniae és capaç d'evadir el sistema immunitari. Aquest fet podria ser degut a que l'adhesina P1/P2 posseeix gran variabilitat antigènica per una alta taxa de recombinacions genètiques, que impedeixen una resposta immune específica tipus IgG de memòria. Per aquesta raó, la immunitat protectora generada per la infecció és de duració limitada.



Estructura cel·lular de *M. pneumoniae*



Orgànel amb forma de punxa per a l'adhesió.

Adhesió de *M. pneumoniae* a les cèl·lules ciliades de l'epiteli respiratori

Per una altra banda, els glicolípidis i adhesines del bacteri presenten una alta homologia amb els teixits dels mamífers, fet que afavoreix les reaccions d'anticossos creuades, i el desenvolupament d'esdeveniments autoimmunes. A la primoinfecció es pot detectar una resposta immunitària ràpida amb producció d'alts nivells d'anticossos, primer de tipus IgM i tot seguit d'IgG a les dues setmanes; les primoinfeccions es donen sobretot en la població infantil, ja que la població adulta generalment ha estat infectada prèviament. Així, en la primoinfecció s'aconsegueixen nivells màxims d'anticossos (IgG/IgM) a les 3-6 setmanes, mentre que en les reinfeccions, hi ha una elevada resposta d'IgG i producció d'IgA. Els anticossos IgA es produeixen de manera més precoç que els IgM, arribant a nivells elevats i disminuint abans que les altres immunoglobulines. Per aquesta raó, alguns estudis plantegen que aquests anticossos podrien ser el millor indicador a les infeccions recents en tots els grups d'edat.

Per tant, el coneixement de la resposta immunològica desenvolupada a l'hoste, tindrà rellevància a l'hora d'escollir les tècniques diagnòstiques adequades que ens permetin detectar tots els casos.

MANIFESTACIONS CLÍNiques

Mycoplasma pneumoniae produeix infeccions del tracte respiratori, tant del tracte respiratori superior (TRS), com de l'inferior (TRI), de forma simultània o seqüencial a les 2-3 setmanes postinfecció. A més de tot això, pot causar manifestacions extrapulmonars per diversos mecanismes:

1. Manifestacions pulmonars:

A nivell del TRS, cal destacar que els símptomes són molt inespecífics: febrícula, cefalea, miàlgies, faringitis, rinitis, otitis, miringitis bul·losa, traqueobronquitis (amb tos no productiva)...

En canvi, a nivell del TRI cursa fonamentalment amb pneumònia, però amb presentació clínica i radiològica peculiar: a nivell clínic, podem trobar febre més elevada, tos de tipus "pertusoide" i dispnea en els casos greus. La simptomatologia va lligada a una radiologia molt inespecífica, sense observació de les típiques condensacions que trobaríem en una pneumònia clàssica, produint el que es coneix com a dissociació clínic-radiològica. Per aquest motiu, aquesta entitat s'anomena pneumònia atípica primària.

El quadre clínic varia també en funció de l'edat de l'individu, podent oscil·lar des de la bronquiolitis en nens petits a una pneumònia greu en ancians que requereix hospitalització, i que, en cas d'alteracions del sistema immunològic, pot desenvolupar una infecció respiratòria greu i fulminant.

2. Manifestacions extrapulmonars:

Aquest tipus d'esdeveniments es produeixen en el 7-25% de casos, abans, durant o després del quadre respiratori, o fins i tot, sense cap clínica respiratòria. Poden afectar a qualsevol òrgan, i la gravetat és major que en les pulmonars, ja que es postula que depenen d'una resposta autoimmunitària i de la disseminació hematògena del bacteri amb invasió de teixits.

Les manifestacions extrapulmonars poden classificar-se segons el mecanisme de producció a nivell de l'òrgan diana en:

- Manifestacions de tipus directe: les lipoproteïnes de *M. pneumoniae* estimulen la producció de citoquines al teixit diana (causant inflamació i afavorint la disseminació hematògena del bacteri per les fissures produïdes pel TNF- α en les unions laterals de les cèl·lules danyades de l'epiteli respiratori).
- Manifestacions de tipus indirecte: produïdes per reaccions creuades entre els components bacterians i les cèl·lules humanes, o per depòsit d'immunocomplexos (per exemple, la síndrome de Guillain-Barré).
- Manifestacions vasculars: oclusió vascular. *M. pneumoniae* indueix vasculitis o trombosi, o totes dues, amb o sense estat d'hipercoagulabilitat sistèmica, que donen lloc al procés patològic en el teixit diana.

Aquests tres tipus de mecanismes no són exclouents entre si, es poden donar els tres simultàniament en el mateix òrgan (veure Taula 1: Manifestacions extrapulmonars).

DIAGNÒSTIC MICROBIOLÒGIC

Com ja s'ha comentat prèviament, hi ha diferents factors que dificulten l'aïllament de *M. pneumoniae* de mostres respiratòries, però el principal és que el seu cultiu requereix medis de cultiu complexes, que continguin esterols, àcids grassos, aminoàcids i d'altres compostos que satisfacin els seus requeriments nutricionals. A més, han de incloure penicil·lina per inhibir el creixement d'altres bacteris. La seva elaboració és laboriosa i requereix de controls de tots i cadascun dels seus components. Aquest fet i la seva baixa sensibilitat fa que avui dia pocs laboratoris clínics realitzin el cultiu com mètode de diagnòstic de les infeccions per micoplasma.

Degut a la facilitat de recollida de les mostres i a la disponibilitat de múltiples proves, la serologia ha estat la principal eina diagnòstica per detectar *M. pneumoniae*. Aquest microorganisme posseeix a la seva membrana externa antigens proteics i glicolípidics que generen una resposta d'anticossos en els indivi-

Manifestacions extrapulmonars produïdes per <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
Sistema hematopoètic	Anèmia hemolítica (associada a crioglobulines), púrpura trombòtica trombocitopènica
	Meningoencefalitis, paràlisi ascendent (síndrome de Guillain-Barré), neuritis òptica, paràlisi de nervis cranials, atàxia, psicosi
Pell	Erupció eritematosa papular o vesicular, sind. de Stevens-Johnson
	Miàlgies, artràlgies i poliartritis. Artritis sèptica (en casos d'hipogammaglobulinèmia)
Cardíac	Pericarditis, miocarditis i vessament pericàrdic
	Glomerulonefritis, nefropatia IgA, nefritis tubulointersticial
Gastrointestinal	Vòmits, diàrees, hepatitis colèstica i pancreatitis
Altres	Òtic: otitis externa, mitjana i miríngitis Muscular: rabdomiòlisi Òptic: conjuntivitis, uveïtis anterior, retinitis i neuritis òptica Genital: abscessos tub-ovàrics

Manifestacions extrapulmonars de *M. pneumoniae*

ductus infectats. La proteïna P1 és la principal diana de la resposta d'anticossos i és també l'antigen més utilitzat en les tècniques serològiques.

En el pacient immunocompetent es produeix una resposta ràpida d'anticossos que arriba al seu màxim valor als 21-40 dies, per disminuir posteriorment i persistir durant mesos o anys. Per tant, el criteri de referència de molts autors pel diagnòstic de la pneumònia per *M. pneumoniae* és la demostració de seroconversió, es a dir, d'un increment d'almenys quatre vegades el títol d'anticossos en mostres de sèrum aparellades: la primera mostra obtinguda a la fase aguda de la infecció i la segona a la fase de convalescència (a les 3 setmanes). Ambdues mostres han de ser treballades simultàniament en paral·lel per poder determinar si existeix variació en el títol d'anticossos. Les tècniques serològiques disponibles són:

Fixació del complement (FC): Les primeres determinacions de la resposta immunològica específica enfront a *M. pneumoniae* es van realitzar amb aquesta tècnica, utilitzant com antígens, be un extracte glicolipídic o be l'extracte bacterià complet. La FC detecta indistintament IgG com IgM. La sensibilitat i especificitat són variables, però els valors predictius positius i negatius són baixos. Els inconvenients d'aquesta tècnica són la possibilitat de reaccions creuades amb antígens glicolipídics d'altres espècies de micoplasma, la necessitat de personal especialitzat i la manca d'estandardització.

Tècniques d'aglutinació de partícules sensibilitzades: Fan servir un suport de partícules de làtex, hematies o gelatina (les més utilitzades a l'actualitat), recobertes per una barreja d'antígens específics de *M. pneumoniae*. Detecten conjuntament anticossos IgG i IgM. La tècnica d'aglutinació de partícules de gelatina utilitza l'antigen P1 del bacteri i permet una quantificació en base a un banc de dilucions a partir d'1/40. Es considera un resultat positiu significatiu quan es demostra un increment de al menys quatre vegades el títol d'anticossos (demostració de seroconversió). Títols >1/160 en una mostra única de la fase aguda no són conclouents i permeten tan sols un diagnòstic de probabilitat.

Per tal d'aconseguir una màxima sensibilitat, es recomana realitzar la determinació en dos mostres seriades.

Tècnica d'enzimoinmunoanàlisi (EIA): És la tècnica més utilitzada en tots els laboratoris clínics. Existeix una àmplia varietat de reactius comercialitzats en base a preparats antigènics diversos, com la barreja

d'antígens crus, les proteïnes purificades, glucolipídics purificats o pèptids sintètics. La presentació també pot variar en tècniques de captura- μ , microplaca o en suport de membranes per a la detecció d'IgM o detecció conjunta d'IgG i IgM, per aquesta última presentació. En qualsevol cas, per tenir una bona sensibilitat diagnòstica amb les tècniques de EIA, es necessari disposar d'una mostra de sèrum del període de convalescència.

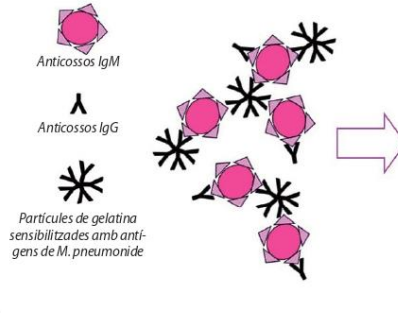
Tècniques moleculares: La fàcil manipulació de les tècniques de PCR convencionals o a temps real i l'existència de reactius comercials per detectar *M. pneumoniae*, individual o conjuntament amb altres bacteris productors d'infeccions respiratòries al mateix temps (tècniques multiplex) ha contribuït a la seva introducció en la rutina de molts laboratoris clínics, fins i tot en estudis epidemiològics poblacionals que tradicionalment es basaven en el diagnòstic microbiològic indirecte. La diana escollida per a la majoria de les tècniques de PCR (tant casolanes com comercials) és la regió P1 de l'adhesina, però també s'utilitzen altres com el gen 16S ARNr, el gen ATPase operon gene, el gen tuf o l'element repetitiu repMp1 i, més recentment, el gen que codifica la toxina CARDS.

Les principals avantatges d'aquestes tècniques són la seva elevada sensibilitat, especificitat, i rapidesa, amb la possibilitat d'obtenir resultats en el mateix dia. Els millors rendiments de PCR s'obtenen en mostres d'aspirat o exsudat nasofaríngic preses amb escovilló. La persistència de micoplasma a nivell nasofaríngic després del tractament antibiòtic, ha suggerit la necessitat de quantificar i delimitar un número de còpies/mL que permeti diferenciar la infecció clínica de la colonització residual.

TRACTAMENT

La majoria de quadres clínics produïts per *M. pneumoniae* solen ser autolimitats, i es poden resoldre de manera espontània sense necessitat de tractament antibiòtic. Tal i com hem destacat prèviament, els micoplasmes no tenen paret cel·lular, fet que els converteix en bacteris resistents a tots aquells antibiòtics que afecten a la mateixa (betalactàmics i glicopèptids). Per aquesta raó, en aquells casos més greus en que és necessari una teràpia antimicrobiana, els macròlids són el tractament d'elecció, i com alternativa, quinolones i tetraciclins. El problema és que ambdós tractaments alternatius estan contraindicats en nens (les quinolones per toxicitat articular i les tetraciclins per poder causar calcificacions de teixits en nens menors de vuit anys).

Diagnòstic de la infecció per *M. pneumoniae* amb tècniques serològiques d'aglutinació de partícules de gelatina.



Pouet positiu: es produeix aglutinació.

Pouet negatiu: no es produeix aglutinació (les partícules es depositen al fons).

Per una altra banda, en els últims anys s'han descrit a nivell mundial soques resistents a macròlids, majoritàriament en Àsia. A Japó, dades recents suggereixen que aquests aïllaments s'han estès des de l'any 2000. La resistència a macròlids ve donada per la presència de mutacions puntuals en el domini V de 23S rRNA, que causen resistència d'alt o baix nivell.

L'aprofundiment en l'estudi d'aquest microorganisme (epidemiologia, transmissió, tipatge de soques i resistència a antibiòtics), ens permetrà millorar el diagnòstic definint nous criteris "gold standard", adequat el tractament empíric a l'ecologia del medi i permetent-nos una actuació ràpida i eficaç, afavorint un òptim maneig dels pacients.

BIBLIOGRAFIA

1. Matas L, Ausina V. Diagnóstico serológico de las infecciones por *M. pneumoniae*. Control Calidad SEIMC
2. Waites KB, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. Clin. Microbiol Rev 2004; 17:697-728.
3. Ausina V, Rodrigo C. Infecciones causadas por micoplasmas. En: Farreas-Rozman (eds). Medicina Interna, 15ª ed. Madrid: Elsevier España SA, 2004; pp 2362-2365.
4. Pereyre S, Charron A, Renaudin H, Bébéar C. First Report of Macrolide-Resistant Strains and Description of a Novel Nucleotide Sequence Variation in the P1 Adhesin Gene in *Mycoplasma pneumoniae* Clinical Strains Isolated in France over 12 Years. J Clin Microbiol, 2007; 45:3534-3539
5. Atkinson TP, Balish MF, Waites KB. Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. FEMS Microbiol Rev. 2008 Nov;32(6):956-73
6. Matsuoka M, Narita M. Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan. Antimicrob Agents Chemother. 2004 Dec;48(12):4624-30
7. Waller JL, Diaz MH. Detection and characterization of *Mycoplasma pneumoniae* during an outbreak of respiratory illness at a university. J Clin Microbiol. 2014 Mar;52(3):849-53
8. Dorigo-Zetsma, J.W., B. Wilbrink, H. van der Nat, A. I. Bartelds, M. L. Heijnen, and J. Dankert. 2001. Results of molecular detection of *Mycoplasma pneumoniae* among patients with acute respiratory infection and in their household contacts reveals children as human reservoirs. J. Infect. Dis. 183:675-678.
9. Gnarpe, J., A. Lundback, B. Sundelof, and H. Gnarpe. 1992. Prevalence of *Mycoplasma pneumoniae* in subjectively healthy individuals. Scand. J. Infect. Dis. 24:161-164.
10. Saraya T. The History of *Mycoplasma pneumoniae* Pneumonia. Front Microbiol. 2016 Mar 22;7:364

Publicitat



CONSISTENCIA
LOTE A LOTE

SOPORTE TÉCNICO
ESPECIALIZADO

PRECIO
COMPETITIVO

Según normativa
ISO, Ph. Eur, USP,
APHA y AOAC.

Labbox Labware S.L.

902 995 318
clientes@labbox.com



www.labbox.com

MEDIOS DE CULTIVO

labkem



HOSPITALES PÚBLICOS Y PRIVADOS
LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
VETERINARIOS Y FITOSANITARIOS



INDUSTRIAS FARMACÉUTICA Y COSMÉTICA
INDUSTRIAS ALIMENTARIA Y AGRÍCOLA



TRATAMIENTO
DE AGUAS



CENTROS DE INVESTIGACIÓN
UNIVERSIDADES E INSTITUCIONES
GUBERNAMENTALES

