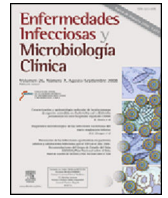




Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



ORIGINAL BREVE

Tratamiento antibiótico dirigido en infecciones por *Mycoplasma genitalium*: análisis de mutaciones asociadas con resistencia a macrólidos y fluoroquinolonas



Luis Piñeiro^{a,*}, Pedro Idigoras^a, Idoia de la Caba^a, Maddi López-Olaizola^a y Gustavo Cilla^{a,b}

^a Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Donostia-Instituto de Investigación Sanitaria BioDonostia, San Sebastián, España

^b Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Respiratorias (CIBERES), San Sebastián, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 1 de agosto de 2018

Aceptado el 3 de octubre de 2018

On-line el 3 de noviembre de 2018

Palabras clave:

Mycoplasma genitalium
Susceptibilidad antibiótica
Tratamiento dirigido

R E S U M E N

Introducción: El objetivo de este trabajo fue analizar la susceptibilidad de *Mycoplasma genitalium* a macrólidos y fluoroquinolonas mediante técnicas moleculares.

Métodos: La susceptibilidad a macrólidos se analizó (Gipuzkoa, 2014-2017) mediante PCR en tiempo real con sondas (gen 23S ARNr) y a fluoroquinolonas mediante secuenciación tras PCR convencionales (genes *parC/gyrA*).

Resultados: Se detectaron mutaciones asociadas con resistencia a macrólidos en 43/263 (16,3%) casos y con posible resistencia a fluoroquinolonas en 21/267 (7,9%). La resistencia a macrólidos fue más frecuente tras tratamiento previo con azitromicina (76,5 vs. 7,4%; $p < 0,001$) y con la pauta única de 1 g (31,3 vs. 7% pauta ampliada, $p < 0,001$). Se detectaron 5/245 (2%) casos con mutaciones de posible resistencia para ambos antibióticos.

Conclusiones: La técnica empleada para el estudio de la susceptibilidad de *Mycoplasma genitalium* a la azitromicina permitió una respuesta rápida con un tratamiento antibiótico dirigido. Moxifloxacino puede ser una buena alternativa en casos con resistencia a macrólidos.

© 2018 Elsevier España, S.L.U.

y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Guided antibiotic therapy for *Mycoplasma genitalium* infections: Analysis of mutations associated with resistance to macrolides and fluoroquinolones

A B S T R A C T

Introduction: The objective of this study was to analyse the susceptibility of *Mycoplasma genitalium* to macrolides and fluoroquinolones using molecular techniques.

Methods: Susceptibility to macrolides was tested (Gipuzkoa, 2014-2017) by a rapid probe-based real-time polymerase chain reaction assay (23S rRNA gene) and to fluoroquinolones by sequencing the *parC* and *gyrA* genes.

Results: Mutations associated with macrolide resistance were detected in 43/263 (16.3%) cases and potential fluoroquinolone resistance in 21/267 (7.9%). Macrolide resistance was more frequent in patients previously treated with azithromycin (76.5% vs 7.4%, $P < .001$) as well as in those treated with a single 1 g dose (31.3%) vs the extended regimen (7%, $P < .001$). There were 5/245 (2%) cases with mutations probably associated with resistance to both antibiotics.

Conclusions: The technique used for testing *Mycoplasma genitalium* susceptibility to azithromycin allowed the rapid implementation of resistance-guided antibiotic therapy. Moxifloxacin could be a good option in cases of macrolide resistance.

© 2018 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Keywords:

Mycoplasma genitalium
Antibiotic susceptibility
Guided therapy

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: luisdario.pineirovazquez@osakidetza.eus (L. Piñeiro).

Introducción

Mycoplasma genitalium (*M. genitalium*) es una causa importante de infecciones de transmisión sexual (ITS), frecuentemente persistentes y/o recurrentes¹. Las características de esta bacteria, sin pared celular y pequeño genoma, influyen en la dificultad y lentitud (semanas) de su aislamiento en medios de cultivo. El reciente desarrollo de técnicas moleculares ha permitido implementar el diagnóstico de este microorganismo en los laboratorios clínicos. La pauta de tratamiento actualmente indicada es azitromicina vo 500 mg el primer día ampliada con 250 mg/día 4 días, empleándose moxifloxacino vo 400 mg 7-14 días como alternativa o en casos de recidiva o infección complicada².

La monitorización de la resistencia a macrólidos en *M. genitalium* está cobrando especial interés, describiéndose en algunos países tasas variables y crecientes (~15-70%)^{3,4}. Ello ha cuestionado su empleo como tratamiento empírico en las uretritis y otras ITS no gonocócicas, recomendando algunos autores en su lugar doxiciclina vo 200 mg/día 7 días⁵. Sin embargo, las tasas de curación referidas con doxiciclina son bajas (30-40%)^{1,2}.

En esta situación, y siendo la susceptibilidad antibiótica de *M. genitalium* aún poco conocida en España^{6,7}, los objetivos de este trabajo han sido (1) analizar la susceptibilidad a macrólidos de esta bacteria en Gipuzkoa, empleando técnicas moleculares que faciliten la rápida elección del tratamiento más adecuado y (2) conocer su susceptibilidad a fluoroquinolonas.

Métodos

El estudio se realizó entre 2014 y 2017 en el Hospital Universitario Donostia, Gipuzkoa (población atendida ~600.000 habitantes). Las muestras recibidas para diagnóstico microbiológico de pacientes con sospecha de ITS (uretritis, cervicitis, contactos asintomáticos, cribado gestacional...) se analizaron diariamente empleando una técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR) que detecta simultáneamente ADN de *M. genitalium* y otros 6 microorganismos (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* y *Mycoplasma hominis*) relacionados con ITS (Allplex™ STI Essential Assay, Seegene). Las muestras en las que se detectó *M. genitalium* fueron analizadas en menos de 24 h con una segunda PCR-TR casera (termociclador LightCycler, Roche) que amplifica un fragmento del gen 23S ARNr y diferencia mediante el empleo de sondas entre cepas salvajes (T_m melting ~59 °C) y cepas con mutaciones (posiciones 2058 y 2059) asociadas a resistencia a macrólidos (T_m melting ~50-55 °C, figura suplementaria)³. Los pacientes recibieron tratamiento dirigido (azitromicina o moxifloxacino), consejo de control a sus contactos sexuales y fueron citados para realizar un test de cura a las 4-6 semanas.

Con posterioridad, y para conocer la mutación específica en el gen 23S ARNr de las cepas resistentes, se realizó otra PCR convencional empleando los mismos cebadores sin sondas (Thermal Cycler, Applied Biosystems), seguida de secuenciación (3130XL Genetic Analyzer, Applied Biosystems) y comparación de las secuencias obtenidas con la de la cepa patrón MG37 (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>); la duración de estos procesos es $\geq 3-4$ días. Finalmente, el estudio de susceptibilidad a fluoroquinolonas se realizó mediante PCR convencionales que amplifican un fragmento del gen *parC* y otro del gen *gyrA*^{8,9}, comparando posteriormente las secuencias obtenidas con la de la cepa MG37.

Resultados

Se analizaron 14.167 muestras de distintas localizaciones y episodios de infección en 8.388 pacientes, detectándose ADN de *M. genitalium* en 437 muestras de 330 pacientes (3,9% [IC 95% 3,5-4,3%]) de 16-67 años de edad (mediana 30 años). Se dispuso de muestra o ADN sobrante para análisis de resistencias a antimicrobianos en 313 pacientes (202 hombres, 111 mujeres) que procedían de atención primaria (65%, derivados y atendidos en Microbiología), Ginecología (21%, 1/3 para cribado gestacional de ITS), centro de ITS (9%), Urología (2%), y Urgencias (3%).

El gen 23S ARNr se pudo amplificar en 263/313 pacientes (84%, 96,1% en las muestras con $Ct \leq 35$), detectándose cepas resistentes a macrólidos en 43 (16,3% [IC 95% 12,4-21,3%]) (tabla 1). La resistencia fue mayor en hombres que en mujeres (22,2 vs. 4,6%; $p < 0,001$) y en hombres que tienen sexo con hombres que en hombres heterosexuales (32,5 vs. 17,6%; $p = 0,045$) (tabla 2). Se detectaron cepas resistentes en 17/229 pacientes (7,4% [IC 95% 4,7-11,6%]) que no habían recibido tratamiento previo recientemente con azitromicina, si bien estos valores fueron de 26/34 (76,5% [IC 95% 59,8-87,5%]) entre los pacientes con infección persistente o recurrente tras el tratamiento de episodios en los que se detectaron cepas inicialmente sensibles ($p < 0,001$) (tabla 2). Estas cepas resistentes detectadas tras un tratamiento previo con azitromicina representaron el 60,5% (26/43) del total de cepas resistentes. El desarrollo de resistencia también fue mayor en los 21/67 (31,3% [IC 95% 21,5-43,2%]) pacientes en los que se había empleado la pauta única de 1 g de azitromicina, que en los 12/171 (7% [IC 95% 4,1-11,9%]) que habían recibido la pauta ampliada ($p < 0,001$).

Los genes *parC/gyrA* se pudieron amplificar en 267/313 pacientes, detectándose mutaciones con posible asociación a resistencia en 21 (7,9% [IC 95% 5,2-11,7%]), solo en el gen *parC* (tabla 1). De estos 21 pacientes, 16 fueron tratados exitosamente con azitromicina, pero se detectaron 5/245 (2%) casos con mutaciones de resistencia para macrólidos y fluoroquinolonas. Estos 5 pacientes fueron tratados con moxifloxacino (en el momento de indicar este tratamiento se desconocía el resultado de las mutaciones a fluoroquinolonas): en 2 casos la infección se resolvió, 2 casos no acudieron a control y en el quinto caso se volvió a detectar *M. genitalium* en el test de cura. Este paciente fue tratado con doxiciclina, tras considerar improbable una reinfección en el estudio de contactos, resolviéndose finalmente.

Discusión

En este trabajo, en menos de 24 h tras la detección de *M. genitalium* con una PCR-TR comercial, se utilizó una PCR-TR casera adicional indicada para la diferenciación entre cepas salvajes (sensibles) y cepas con las mutaciones más frecuentemente asociadas con resistencia a macrólidos³. Esta rapidez permitió realizar un tratamiento dirigido o modificar la pauta empírica en caso necesario. Recientemente se han desarrollado PCR-TR comerciales que detectan las principales mutaciones asociadas a resistencia^{10,11}.

La tasa de resistencia global a macrólidos en *M. genitalium* detectada en Gipuzkoa fue del 16,3%. Esta cifra está en el rango de las referidas en otros trabajos realizados en población general (14-38%)^{3,12,13}, pero es inferior a la descrita en pacientes que acuden a centros de ITS (35-72%)^{4,6,9-11,14} (tabla suplementaria). Esta diferencia puede ser debida a la mayor presión antibiótica con macrólidos por el mayor número de ITS tratadas con azitromicina en pacientes atendidos en centros de ITS, especialmente hombres

Tabla 1
Posición y frecuencia de las mutaciones detectadas en los genes 23S ARNr, *parC* y *gyrA* de *Mycoplasma genitalium*

Gen	Mutación nucleótido ^a	Cambio aminoácido ^a	Número (%)
23S ARNr (n = 263)	A→G 2071 (2058)		21 (8)
	A→G 2072 (2059)		19 (7,2)
	A→G 2071/2 (2058/9)		2 (0,8)
	A→C 2072 (2059)		1 (0,4)
	Total		43 (16,3)^c
Total <i>parC</i> (n = 267)	G→A 205 ^b	Ala→Thr 69 (66)	2 (0,7)
	G→A 244	Asp→Asn 82 (79)	2 (0,7)
	G→A 248	Ser→Asn 83 (80)	5 (1,9)
	G→T 248	Ser→Ile 83 (80)	6 (2,2)
	G→T 259	Asp→Tyr 87 (84)	2 (0,7)
	G→A 284 ^b	Ser→Asn 95 (92)	2 (0,7)
	C→T 302 ^b	Thr→Ile 101 (98)	2 (0,7)
	Total		21 (7,9)
	C→T 219 ^b	No	1 (0,4)
	G→A 225 ^b	No	1 (0,4)
Total <i>gyrA</i> (n = 267)	C→T 234	No	17 (6,4)
	C→T 285 ^b	No	8 (3)
	Total		27 (10,1)
	T→C 252 ^b	No	2 (0,7)
T→C 315 ^b	No	1 (0,4)	
Total		3 (1,1)	

^a Respecto a la cepa *M. genitalium* G37 (numeración *E. coli*).

^b No descritas previamente.

^c En 3 casos se detectó la cepa con mutación junto con la cepa salvaje y en 2 no se pudo identificar la mutación (posición 2058 o 2059).

Negrita: número total (y porcentaje) de casos con mutaciones asociadas a resistencia a macrólidos y posible resistencia a fluoroquinolonas.

Tabla 2
Diferencias observadas en las tasas de resistencia a macrólidos en función del tratamiento previo con azitromicina, la pauta empleada o el servicio de procedencia de los pacientes

	Número	Resistentes	%	Chi-cuadrado (p)
Tratamiento previo con azitromicina^a				103,2
Sí	34	26	76,5	(<0,001)
No	229	17	7,4	
Total	263	43	16,3	
Pauta azitromicina^b				23,9
Única	67	21	31,3	(<0,001)
Ampliada	171	12	7	
Total	238	33	13,9	
Servicio de procedencia				0,1
Centro de ITS	24	5	20,8	(0,74)
Resto	239	38	15,9	
Atención primaria	172	30	17,4	
Ginecología	54	4	7,4	
Otros (urología + urgencias)	13	4	30,8	
Total	263	43	16,3	

^a Veinticinco pacientes no fueron tratados con macrólidos.

^b Pauta única: 1 g; pauta ampliada: 0,5-1 g + 250 mg × 4 días.

^a y ^b La detección de resistencia a azitromicina fue mayor en hombres que en mujeres (39/176 [22,2%] vs. 4/87 [4,6%], $p < 0,001$), y en hombres que tienen sexo con hombres que en hombres heterosexuales (13/40 [32,5%] vs. 22/125 [17,6%], $p = 0,045$).

que tienen sexo con hombres (tabla 2 y tabla suplementaria). La resistencia observada en el presente estudio refleja mejor la tasa en población general, ya que un 65% de los pacientes procedían de atención primaria y < 10% de un centro de ITS.

La resistencia primaria a macrólidos (sin tratamiento reciente) fue solo del 7,4%, mientras que la resistencia secundaria en pacientes con tratamiento previo con azitromicina en cepas inicialmente sensibles fue del 76,5% (60% de las resistencias detectadas). Esto indica que durante el tratamiento se induce la mutación responsable de la resistencia y/o que se seleccionan cepas resistentes inicialmente minoritarias (en 3/43 pacientes se detectaron cepas sensibles y resistentes en la misma muestra)^{3,11,15}, aunque no podemos descartar que en algún caso se produzca una reinfección por una cepa resistente. Por otra parte, ha sido descrito y los resultados de este estudio claramente apoyan, que las tasas de resistencia a macrólidos en infecciones por *M. genitalium* tratadas tras pauta

única de un gramo son superiores a las detectadas tras la pauta ampliada (0,5 o 1 g día 1, 250 mg/día días 2-5)². Dada esta diferencia y la baja respuesta clínica referida con doxiciclina^{1,2}, los resultados del presente estudio apoyan el tratamiento dirigido (< 24 h) tras un análisis de susceptibilidad a macrólidos en estas infecciones.

El tratamiento alternativo a los macrólidos recomendado en las ITS por *M. genitalium* es fluoroquinolonas². En el presente estudio se detectaron mutaciones con posible asociación a resistencia en el gen *parC* en el 7,9% de los pacientes, habiéndose descrito en otros trabajos cifras de 3-29% (tabla suplementaria)^{6,8-10,12,14}. A diferencia de las mutaciones en el gen 23S ARNr y la resistencia a macrólidos¹⁵, las mutaciones descritas en la región codificante de resistencia a quinolonas (QRDR) de los genes *parC* y *gyrA* en *M. genitalium*, no siempre tienen una adecuada concordancia con la respuesta clínica, habiéndose referido algunas diferencias en función de la mutación implicada y con la carga bacteriana¹⁴. En este

estudio solo 5/245 (2%) pacientes presentaron mutaciones de resistencia a macrólidos y quinolonas, habiéndose resuelto clínicamente con el tratamiento con moxifloxacino 2/3 y posiblemente también los 2 que no acudieron al control.

En conclusión, los resultados de este trabajo ponen de manifiesto la importancia de la detección de *M. genitalium* en las ITS y la conveniencia del análisis de su susceptibilidad a macrólidos con técnicas rápidas. La tasa de resistencia a macrólidos (16%, 7% en pacientes sin tratamiento previo) en población general fue inferior a la referida en estudios realizados en pacientes atendidos en centros de ITS. En esta ITS es importante realizar un control de cura, dada la frecuente detección de mutaciones durante el tratamiento en casos de recidiva. Moxifloxacino en esos casos es una buena alternativa, con una tasa de mutaciones con posibles resistencias detectadas inferior al 10%, permitiendo esta estrategia reservar el tratamiento con doxiciclina para los pocos casos con resistencia a macrólidos y fallo clínico a fluoroquinolonas.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Anexo. Material adicional

Se puede consultar material adicional a este artículo en su versión electrónica disponible en [doi:10.1016/j.eimc.2018.10.003](https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.10.003)

Bibliografía

1. Workowski KA, Bolan GA, Centers for Disease Control and Prevention. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. *MMWR Recomm Rep.* 2015;64 (RR-03):1–137.
2. Jensen JS, Cusini M, Gomberg M, Moi H. 2016 European guideline on *Mycoplasma genitalium* infections. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2016;30:1650–6.
3. Touati A, Peuchant O, Jensen JS, Bébéar 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;52:1549–55.
4. Basu I, Roberts SA, Bower JE, Henderson G, Reid M. High macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium* strains causing infection in Auckland, New Zealand. *J Clin Microbiol.* 2017;55:2280–2.
5. Horner PJ, Blee K, Falk L, van der Meijden W, Moi H. 2016 European guideline on the management of non-gonococcal urethritis. *Int J STD AIDS.* 2016;27:928–37.
6. Barberá MJ, Fernández-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. *Sex Transm Dis.* 2017;44:457–62.
7. Otero-Guerra L, Vazquez F. Impact of microbial resistance on therapeutic decisions in sexually transmitted infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2018;36:149–51.
8. Shimada Y, Deguchi T, Nakane K, Masue T, Yasuda M, Yokoi S, et al. Emergence of clinical strains of *Mycoplasma genitalium* harbouring alterations in ParC associated with fluoroquinolone resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;36:255–8.
9. Tagg KA, Jeoffreys NJ, Couldwell DL, Donald JA, Gilbert GL. Fluoroquinolone and macrolide resistance-associated mutations in *Mycoplasma genitalium*. *J Clin Microbiol.* 2013;51:2245–9.
10. Unemo M, Salado-Rasmussen K, Hansen M, Olsen AO, Falk M, Golparian D, et al. Clinical and analytical evaluation of the new Aptima *Mycoplasma genitalium* assay, with data on *M. genitalium* prevalence and antimicrobial resistance in *M. genitalium* in Denmark, Norway and Sweden in 2016. *Clin Microbiol Infect.* 2017; S1198–743X(17):30504–9.
11. Tabrizi SN, Tan LY, Walker S, Twin J, Poljak M, Bradshaw CS, et al. Multiplex assay for simultaneous detection of *Mycoplasma genitalium* and macrolide resistance using PlexZyme and PlexPrime technology. *PLoS One.* 2016;11:e0156740.
12. Le Roy C, Hénin N, Pereyre S, Bébéar C. Fluoroquinolone-resistant *Mycoplasma genitalium*, Southwestern France. *Emerg Infect Dis.* 2016;22:1677–9.
13. Salado-Rasmussen K, Jensen JS. *Mycoplasma genitalium* testing pattern and macrolide resistance: A Danish nationwide retrospective survey. *Clin Infect Dis.* 2014;59:24–30.
14. Murray GL, Bradshaw CS, Bissessor M, Danielewski J, Garland SM, Jensen JS, et al. Increasing macrolide and fluoroquinolone resistance in *Mycoplasma genitalium*. *Emerg Infect Dis.* 2017;23:809–12.
15. Jensen JS, Bradshaw CS, Tabrizi SN, Fairley CK, Hamasuna R. Azithromycin treatment failure in *Mycoplasma genitalium*-positive patients with nongonococcal urethritis is associated with induced macrolide resistance. *Clin Infect Dis.* 2008;47:1546–53.