



Cristian Mateo León
Diego García Martínez de Artola
Berta Pino-Calm

Elevada tasa de resistencia a macrólidos y fluoroquinolonas en *Mycoplasma genitalium* en el área sur de Tenerife

Servicio de Microbiología y Parasitología Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Tenerife, Spain

Article history

Received: 29 January 2023; Revision Requested: 14 February 2023; Revision Received: 6 March 2023;
Accepted: 23 March 2023; Published: 8 May 2023

RESUMEN

Introducción. *Mycoplasma genitalium* (MG) es un reconocido patógeno de transmisión sexual. El aumento de las resistencias asociadas a las principales líneas de tratamiento (macrólidos y quinolonas) justifican un estudio genético de mutaciones para mejorar las tasas de curación.

Material y métodos. Un total de 8.508 muestras fueron analizadas entre abril de 2018 y julio de 2022 para la detección de MG mediante la técnica de PCR multiplex Allplex™ STI Essential Assay. En los casos positivos para MG se estudió el dominio V del gen *23S rRNA* y los genes *gyrA* y *parC*. Se evaluó la importancia clínica de las mutaciones y se revisaron las historias clínicas para obtener información demográfica y de tratamiento.

Resultados. Se realizó estudio de resistencias a 92 muestras (65 hombres y 27 mujeres). En lo relativo al estudio genotípico, 28 pacientes presentaban mutaciones a macrólidos (30,43%). La más habitual fue A2059G (18,48%). Para las quinolonas, 5 pacientes (5,43%) presentaron mutaciones clínicamente relevantes en el gen *parC*. Destaca un paciente con la mutación G295 en *gyrA* asociada a G248T en *parC*. Treinta individuos se sometieron al test de cura (TOC). La azitromicina fue el régimen empírico más común y el moxifloxacino la principal alternativa.

Conclusiones. La elevada tasa de resistencias en nuestro entorno evidencia la necesidad de realizar una terapia dirigida por el estudio genotípico de resistencias a macrólidos, apoyándonos en la detección de mutaciones en *parC* y *gyrA* para predecir la susceptibilidad a quinolonas y en el uso del TOC para evaluar la respuesta al tratamiento.

Palabras clave: *Mycoplasma genitalium*, macrólidos, fluoroquinolonas.

Correspondence:
Cristian Mateo León.
Servicio de Microbiología y Parasitología Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria,
Tenerife, Spain.
E-mail: cristianmateoleon@gmail.com.

High macrolides and fluoroquinolones resistance rate in *Mycoplasma genitalium* in southern Tenerife

ABSTRACT

Introduction. *Mycoplasma genitalium* (MG) is a recognized sexually transmitted pathogen. Increasing resistance to main lines of treatment (macrolides and quinolones) justifies a genetic study of mutations to improve cure rates.

Material and methods. A total of 8,508 samples from April 2018 to July 2022 were processed using Allplex™ STI Essential Assay. In MG positive cases *23S rRNA V domain*, *gyrA* and *parC* genes were studied. Mutations detected were checked to assess their clinical significance and medical records were reviewed to obtain demographic and treatment information.

Results. Resistance study was performed on 92 samples (65 men and 27 women). In relation to the genotypic study, 28 patients presented mutations to macrolides (30.43%). Most common was A2059G (18.48%). For quinolones, 5 patients (5.43%) had clinically relevant mutations in *parC* gene. Of note was a patient with G295 mutation in *gyrA* associated with G248T in *parC*. Thirty subjects underwent a test of cure (TOC). Azithromycin was the most common empirical regimen and moxifloxacin the main alternative.

Conclusions. High rate of resistance in our environment evidences the need for targeted therapy by genotypic study of macrolide resistance, supported by the detection of mutations in *parC* and *gyrA* to predict quinolones susceptibility and the use of TOC to evaluate treatment response.

Keywords: *Mycoplasma genitalium*, macrolides, fluoroquinolones.

INTRODUCCIÓN

Mycoplasma genitalium (MG) es un microorganismo de transmisión sexual reconocido como un grave problema de salud a nivel global debido a su alta tasa de resistencia a antimicrobianos. Se asocia a cervicitis, enfermedad pélvica inflamatoria e infertilidad en mujeres, aunque destaca como causante de uretritis no gonocócica en varones, en porcentajes que oscilan entre el 10-30% [1].

Históricamente, la presencia de requerimientos especiales en el cultivo y su lento crecimiento dificultan su identificación y la realización del antibiograma. En la actualidad, las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos han supuesto una revolución en el diagnóstico de este patógeno [2].

En relación al tratamiento, la ausencia de pared celular limita las opciones terapéuticas. Las últimas recomendaciones de The International Union against Sexually Transmitted Infections (IUSTI) proponen como tratamiento de elección azitromicina 500 mg/día 1 día, seguido de 250 mg/ día durante 4 días. No obstante, en los últimos años, diferentes metaanálisis han notificado un importante incremento de las resistencias asociadas a macrólidos; del 10 % en estudios anteriores a 2010, a alrededor del 50 % en estudios publicados en 2016 y 2017 [3].

La principal alternativa terapéutica son las fluoroquinolonas, con un porcentaje de resistencias mucho menor (7-10%) [4], siendo la pauta más aceptada moxifloxacin 400 mg/día

durante 7 días.

En este contexto, el tratamiento dirigido basado en la detección por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las principales mutaciones que confieren resistencias a macrólidos, permite comenzar de forma precoz con el tratamiento de segunda línea, mejorando el porcentaje de curación inicial de un 60 a un 90 % aproximadamente [5].

Para evaluar la eficacia del tratamiento, la IUSTI recomienda la realización de un test de cura (TOC) a partir de la tercera semana de la finalización del tratamiento [6].

El objetivo de este estudio se centra en conocer la epidemiología y las resistencias asociadas a MG en el área sur de Tenerife, haciendo hincapié en el impacto que estas mutaciones tienen en el tratamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Un total de 8.508 muestras fueron analizadas en el período de abril de 2018 a julio de 2022 para la detección de MG mediante la técnica de PCR multiplex en tiempo real Allplex™ STI Essential Assay (Seegene).

Se excluyeron las muestras positivas de pacientes a los que se le realizó estudio de resistencias dentro de los 3 meses anteriores. Además, una carga bacteriana baja (Ct>30) supuso un importante hándicap para la amplificación y posterior detección de resistencias.

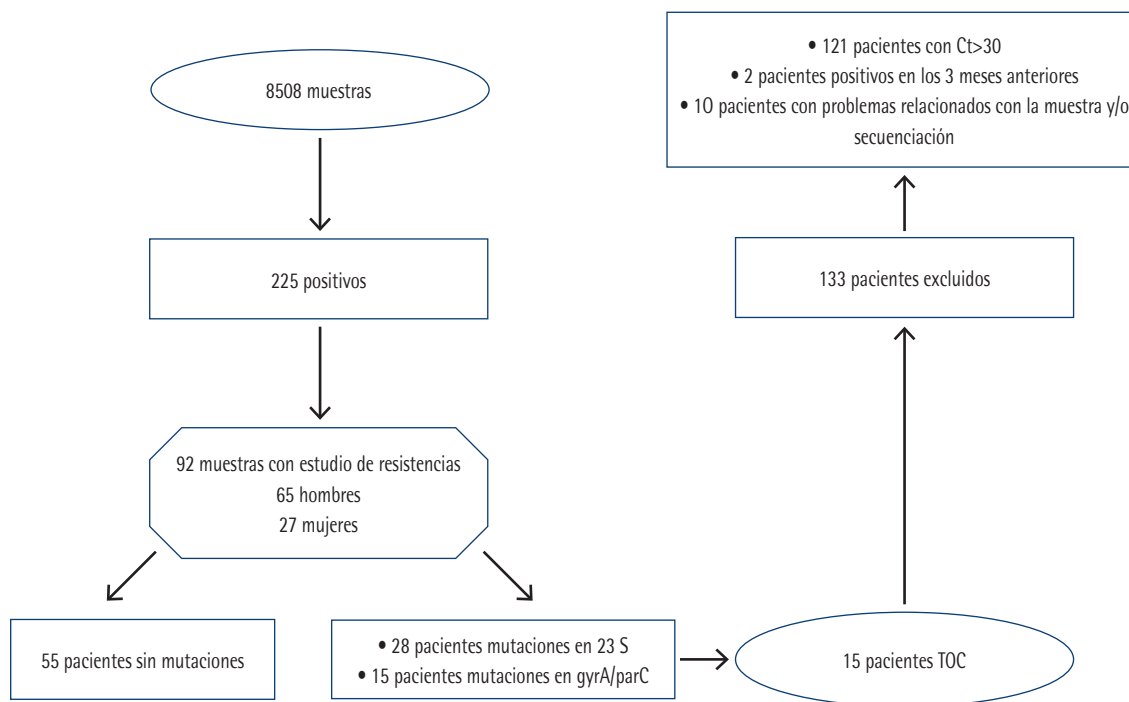


Figura 1 Diagrama de flujo del procesamiento de las muestras.

Tabla 1 Mutaciones detectadas en macrólidos (dominio V 23S) y quinolonas (<i>gyrA</i> y <i>parC</i>).				
Macrólidos: dominio V 23S rRNA	Nº muestras ^a	Hombres	Mujeres	Relevancia clínica
A2058T	1 (1,09%)	1(1,54%)		sí
A2058G	10 (10,87%)	10 (15,38%)		sí
A2059G	17 (18,48)	16 (24,61%)	1 (3,7)	sí
Quinolonas				
<i>parC</i>				
C184T(P62S)	9 (9,78%)	7 (10,17%)	2 (7,40%)	no
G248T(S83I)	1 (1,09%)	1 (1,54%)		sí
G248A (S83N)	1 (1,09%)	1 (1,54%)		sí ^b
G259T (D87Y)	3 (3,26%)	3 (4,61%)		sí
A281T (G94L)	1 (1,09%)	1 (1,54%)		no descrita
<i>gyrA</i>				
G286A(A96T)	1 (1,09%)	1 (1,54%)		no descrita
G295A (D99N) ^d	1 (1,09%)	1 (1,54%)		sí ^c

^aDatos sobre población total a la que se le han realizado resistencias.

^bCaracterísticas similares a C284T (S83I).

^cAsociado a mutaciones en *parC*.

^dAsociada a la mutación G248T(S83I) en *parC*.

El estudio de resistencias se basó en analizar el dominio V del gen 23S rRNA (283pb) [7] para determinar la resistencia frente a macrólidos y la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR) de los genes *gyrA* y *parC*, causantes de resistencia a fluoroquinolonas [8].

Los amplicones fueron secuenciados mediante tecnología Sanger BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) en un secuenciador ABI 3500 (Applied Biosystems).

Las mutaciones detectadas frente a la cepa de referencia *Mycoplasma genitalium* G37 (NC_000908.2) fueron registradas para estudiar si suponían un cambio aminoacídico relacionado con las resistencias descritas en las diferentes bases de datos.

Las historias clínicas de los pacientes fueron revisadas recopilando datos demográficos, tratamiento antibiótico utilizado, realización de test de cura, nueva consulta en el centro o persistencia de los síntomas.

RESULTADOS

Durante el periodo estudiado, 225 muestras fueron positivas para MG (2,64%), con una prevalencia mayor en hombres (3,59%) que en mujeres (1,68%). La mediana de edad fue 38,5 años (rango 14–68).

Después de aplicar los criterios de exclusión se les realizó

el estudio de resistencias a 92 muestras (40.88%), de las cuáles 65 (70.65%) correspondían a hombres y 27 (29,34%) a mujeres (Figura 1).

En las mujeres la muestra de elección fue el exudado endocervical (92.6%), mientras que en los hombres fue el exudado uretral (83,07%) y el rectal (9,23%). También se detectaron 4 casos en orina y 5 en otras localizaciones.

En lo relativo al estudio genotípico, 28 pacientes presentaban mutaciones que confieren resistencias a macrólidos (30,43%). Las más habituales fueron A2058T (1.09%), A2058G (10.87%) y A2059G (18.48%).

Para las quinolonas, en el gen *parC* fueron detectadas mutaciones en 15 pacientes. Sin embargo, sólo 5 de ellos (5,43%), presentaban resistencias con demostrada relevancia clínica. Así, encontramos 1 mutación G248T(S83I) (1.09%), 1 G248A (S83N) (1.09%) y 3 G259T (D87Y) (3.26%). En relación a las mutaciones en *gyrA*, cabe destacar a un paciente que presentaba la mutación G295A (D99N) asociada a G248T(S83I) en *parC*.

El resto de polimorfismos únicos de nucleótido (SNP) no descritos en la bibliografía o sin demostrado significado clínico aparecen recogidos en la Tabla 1.

Con respecto a la antibioterapia, se realizó TOC a 30 pacientes (32.6%), de los cuales 11 presentan resistencias únicamente a macrólidos y 4 a macrólidos y quinolonas.

Tabla 2 Tratamiento empírico, tratamiento de segunda línea y evolución de los pacientes con mutaciones detectadas que realizaron test de cura.						
Paciente	Tratamiento previo	Mutación 23 s	Mutación <i>parC/gyrA</i>	Test de cura	Tratamiento dirigido	Resolución del cuadro
1*	Azitromicina + Doxiciclina	A2059G		-	-	sí
2*	Azitromicina	A2059G		+	Levofloxacino	sí
3*	Penicilina G + azitromicina	A2058T		-	-	sí
4	Azitromicina	A2059G	C184T	+	Moxifloxacino	sí
5	Azitromicina	A2059G		+	Doxiciclina	sí
6	Azitromicina	A2058G		+	ND	ND
7	Azitromicina	A2058G	G248T/ G295A	+	ND	No (minociclina)
8*	Penicilina G+ ceftriaxona + azitromicina	A2059G		+	Moxifloxacino	sí
9	ND	A2059G	G248A	+	ND	ND
10*	Penicilina G	A2059G		-	-	sí
11	ND	A2058G		+	ND	ND
12	Azitromicina	A2059G		-	-	sí
13	Azitromicina	A2059G		+	Moxifloxacino	sí
14	Azitromicina	A2059G		+	Moxifloxacino	sí
15	Azitromicina	A2058G	G259T	+	Moxifloxacino	sí

-: Negativo; +: Positivo; ND: no disponible.

*Paciente 1: coinfección con *Neisseria gonorrhoeae*. Paciente 2: cobertura empírica. Paciente 3 y 10: coinfección con *Treponema pallidum*.

Paciente 8: coinfección con *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* y *Treponema pallidum*.

En la tabla 2 se describen los tratamientos empíricos y el tratamiento dirigido post test de cura de los pacientes con alguna mutación.

Por otro lado, 13 pacientes a los que se les detectó resistencias (13/28) no acudieron a consulta o no realizaron test de cura. Se obtuvo información acerca del tratamiento en 5 de ellos; dos pacientes resolvieron el cuadro clínico con tratamiento empírico con doxiciclina y al resto se les modificó el tratamiento empírico por persistencia de síntomas (en una ocasión se cambió a eritromicina y en los otros 2 se utilizó moxifloxacino).

DISCUSIÓN

Los resultados de nuestro estudio evidencian una prevalencia y una tasa de resistencias a los principales antibióticos implicados en el tratamiento de MG semejantes a lo descrito en la bibliografía [3].

Con respecto a las mutaciones asociadas a la resistencia a macrólidos, los resultados son similares a los publicados en otras regiones del país, siendo la mayoritaria la A2059G (17/28).

[9,10]. En las muestras que presentaron mutaciones, en cuatro pacientes se observó tratamiento previo con 1,5 gramos de azitromicina; esta pauta se ha relacionado con un aumento de las resistencias a macrólidos [3].

Para las fluoroquinolonas, la ausencia de la mutación S83I en *parC* es altamente predictiva de curación con moxifloxacino [11,12]. Otros SNP con relevancia clínica son S83N, D87N y D87Y, aunque su papel está menos establecido y es necesario profundizar en su importancia en el futuro. El papel del gen *parC* ha sido escasamente descrito en estudios nacionales, como el de De Salazar et al [13].

Solamente 5 de nuestros pacientes presentaban mutaciones relevantes clínicamente. La mutación D87Y se encontró en 3 pacientes. En dos de ellos no se realizó test de cura, por lo que no podemos asegurar que se solventara el cuadro, y en el otro individuo el cuadro se resolvió con moxifloxacino. Un paciente presentaba la mutación S83N, del cual no se pudo obtener datos en relación a la antibioterapia ni a la resolución del caso y el último presentaba la mutación G248T(S83I) en *parC* asociada a G295A (D99N) en *gyrA*. Este paciente presentaba persistencia en los síntomas y finalmente fue tratado con minociclina. Aun-

que en nuestro estudio es un caso aislado, algunas mutaciones en *gyrA* se relacionan con fracaso terapéutico, tal y como sugieren las últimas revisiones al respecto [11,14].

En la población estudiada la mayoría de los casos son hombres (65/92) y además suponen prácticamente la totalidad de los positivos con mutaciones (27/28 para macrólidos y 5/5 en las mutaciones clínicamente relevantes para fluoroquinolonas). Entre ellos destacan los episodios de uretritis, siendo el exudado uretral la muestra más frecuente (83% de los casos).

Entre las limitaciones de este estudio se encuentran la difícil amplificación de los genes propuestos cuando la carga bacteriana obtenida en la PCR era insuficiente (Ct >30) y la imposibilidad de obtener un antibiograma para correlacionar los resultados fenotípicos con las mutaciones detectadas. También creemos que sería necesario acortar el tiempo de respuesta incorporando una PCR dirigida a SNP concretos, ya que las resistencias a macrólidos están bien descritas y podríamos obtener información rápida.

Además, aunque el tratamiento de segunda línea con fluoroquinolonas en los pacientes con resistencia a macrólidos supuso la resolución del cuadro en la mayoría de nuestros pacientes, la falta de información desde atención primaria en relación al tratamiento y la no realización del test de cura (30/92 secuenciados) impiden tener unos datos concluyentes sobre la efectividad de los tratamientos.

A pesar de estas limitaciones, los resultados de este estudio son de un valor importante, debido a la gran cantidad de casos secuenciados, el acceso a la información de la mayoría de los tratamientos junto a la evolución clínica de los pacientes, y la adición del estudio del gen *gyrA*.

En conclusión, la elevada tasa de resistencias en nuestro entorno evidencia la necesidad de realizar una terapia dirigida por el estudio genotípico de resistencias a macrólidos, apoyándonos en la detección de mutaciones en *parC* (especialmente S83I) y *gyrA* para predecir la susceptibilidad a quinolonas y en el uso del test de cura para evaluar la respuesta al tratamiento.

FINANCIACIÓN

Los autores declaran no haber recibido financiación para la realización de este estudio.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores no presentan ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

- Jensen JS, Cusini M, Gomberg M, Moi H. 2016 European guideline on *Mycoplasma genitalium* infections. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2016 Aug 9;30(10):1650–6. DOI: 10.1111/jdv.13849.
- Getman D, Cohen S, Jiang A. Distribution of Macrolide Resistant *Mycoplasma genitalium* in Urogenital Tract Specimens from Women Enrolled in a US Clinical Study Cohort. *Clin Infect Dis*. 2022 Jul 23. DOI: 10.1093/cid/ciac602.
- Read TRH, Fairley CK, Tabrizi SN, Bissessor M, Vodstrcil L, Chow EPF, et al. Azithromycin 1.5g Over 5 Days Compared to 1g Single Dose in Urethral *Mycoplasma genitalium*: Impact on Treatment Outcome and Resistance. *Clin Infect Dis*. 2016 Oct 24;64(3):250–6. DOI: 10.1093/cid/ciw719.
- 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. *Lancet Infect Dis*. 2020 Nov;20(11):1302–14. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30154-7.
- Mycoplasma genitalium* - STI Guidelines Australia [Internet]. STI Guidelines Australia. 2021 [cited 2022 Apr 14]. Available from: <https://sti.guidelines.org.au/sexually-transmissible-infections/mycoplasma-genitalium>.
- Jensen JS, 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*. 2022 Feb 19;36(5):641–50. DOI: 10.1111/jdv.17972.
- Nijhuis RHT, Severs TT, Van der Vegt DSJM, Van Zwet AA, Kusters JG. High levels of macrolide resistance-associated mutations in *Mycoplasma genitalium* warrant antibiotic susceptibility-guided treatment. *J Antimicrob Chemother*. 2015 May 20;70(9):2515–8. DOI: 10.1093/jac/dkv136.
- 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(3):255–8. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2010.05.01.
- Fernández-Huerta M, Vall M, Fernández-Naval C, Barberá M-J, Arando M, López L, et al. *Mycoplasma genitalium* macrolide resistance update: Rate among a 2016–2017 cohort of patients in Barcelona, Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2020 Mar 1;38(3):99–104. DOI: 10.1016/j.eimc.2019.06.008.
- Muñoz Santa A, Aramburu Arnuelos J, Bernet Sánchez A, Bellés Bellés A. *Mycoplasma genitalium*: Analysis of mutations associated with macrolide resistance in Lleida, Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2022 Apr;40(4):209–10. DOI: 10.1016/j.eimc.2021.02.010.
- Murray GL, Bodiya K, Vodstrcil LA, Machalek DA, Danielewski J, Plummer EL, et al. *parC* Variants in *Mycoplasma genitalium*: Trends over Time and Association with Moxifloxacin Failure. *Antimicrob Agents Chemother*. 2022 May 17;66(5). DOI:10.1128/aac.00278-22
- Leng X, Zou H, Zhang K, Chen Y, Ke W. Can ParC Ser83Ile status predict fluoroquinolone efficacy in *Mycoplasma genitalium* infection? *Lancet Infect Dis*. 2022 Sep;22(9):1273–4. DOI: 10.1016/S1473-3099(22)00450-9.
- de Salazar A, Barrientos-Durán A, Espadafor B, Fuentes-López A, Chueca N, Garcia F. Macrolide and fluoroquinolone resistance of *Mycoplasma genitalium* in southern Spain, 2018–2019. *Sex Transm Infect*. 2020 Jul 13. DOI: 10.1136/sextrans-2019-054386.
- Chua T-P, Bodiya K, Machalek DA, Garland SM, Bradshaw CS, Plummer EL, et al. Prevalence of *Mycoplasma genitalium* fluoroquinolone-resistance markers, and dual-class-resistance markers, in asymptomatic men who have sex with men. *J Med Microbiol*. 2021 Sep 30;70(9). DOI: 10.1099/jmm.0.001429.