Detección de *Mycoplasma genitalium* y correlación con manifestaciones clínicas en una población del estado Zulia, Venezuela

Naillet Arráiz R., Sonia Colina Ch., Rafael Marcucci J., Netxibeth Rondón G., Francia Reyes S., Valmore Bermúdez P. y Zoila Romero F.

Universidad del Zulia.
Maracaibo, Venezuela

Facultad de Medicina
Centro de Investigaciones Endocrino-Metabólicas "Dr. Félix Gómez"
Sección de Biología Molecular (NAR, NRG, FRS, VBP)
Escuela de Bioanálisis (NAR, SCCH, RMJ, ZRF)

Recibido: 22 octubre 2007

Aceptado: 24 junio 2008

Los autores declaran no tener conflictos de intereses para la ejecución del estudio y publicación de este manuscrito.

Este trabajo recibió co-financiamiento del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (Programa N° CC-0229-07)

Correspondencia a:

Naillet Arráiz Rodríguez
narraiz@cantv.net

Mycoplasma genitalium detection and correlation with clinical manifestations in population of the Zulia State, Venezuela

Diverse studies demonstrate an association between *Mycoplasma genitalium* and urogenital pathologies. The aim of this study was to investigate the prevalence of *M. genitalium* in patients attending gynecological evaluation in private clinics (n = 172). DNA amplification assays of the genes *16S rRNA* and *MgPa* were utilized. The prevalence of *M. genitalium* in the study population was 7.5%. *M. genitalium* was detected in 12.1% and 4.1% of the symptomatic and asymptomatic patients, respectively (p = 0.047). The infection was diagnosed in patients with cervicitis (17.2%) and mucopurulent secretion (16.6%) and the highest prevalence of infections was registered in the 31-40 years age group. No significant association between the presence of *M. genitalium* and individual clinical manifestations or the patients age was showed (p > 0.05). The high prevalence of *M. genitalium* infections, mostly in patients with clinical manifestations showed in this study, warrants the application of diagnostic strategies in the population to investigate the clinical meaning of these microorganisms and to reevaluate therapeutic schemes against non-gonococcal and non-chlamydial infections.

Key words: *Mycoplasma genitalium*, *16S RNA*, *MgPa*, cervicitis, urogenital pathologies, non-gonococcal infections, non-chlamydial infections.

Palabras clave: *Mycoplasma genitalium*, *16S rARN*, *MgPa*, cervicitis, patologías urogenitales, infecciones no gonocócicas, infecciones no clamidiales.

Introducción

Los miembros del género *Mycoplasma* representan un modelo excepcional que se distingue del resto de los organismos procariotas por poseer un pequeño genoma y carecer de pared celular. El potencial patogénico de estos microorganismos ha sido ampliamente debatido debido a que comúnmente colonizan el tracto genital de hombres y mujeres¹⁻³; no obstante, numerosos estudios han reportado una asociación entre *Mycoplasma genitalium* y patologías urogenitales como uretritis, cervicitis, salpingitis, enfermedad inflamatoria pélvica e infertilidad³⁻⁸.

Aunque las patologías mencionadas se han asociado clásicamente a infecciones por *Chlamydia trachomatis*⁹⁻¹² y *Neisseria gonorrhoeae*¹¹⁻¹³, aproximadamente 50% de los casos se explica por otros agentes causales, entre los cuales debería considerarse la posible contribución de *M. genitalium*.

La principal limitación para la investigación de infecciones por micoplasmas es la dificultad para culti-

varlos. La publicación de la secuencia de los genomas de *M. genitalium*¹⁴ y *M. pneumoniae*¹⁵ ha revelado la ausencia de genes de rutas biosintéticas de aminoácidos, lo que hace que estos organismos sean dependientes absolutos de un suministro exógeno, no sólo de aminoácidos, sino de otros precursores biosintéticos como nucleótidos, ácidos grasos y esteroides¹; en consecuencia, estos microorganismos requieren medios de cultivo y condiciones de crecimiento especiales¹⁶, que dificultan el diagnóstico de laboratorio con propósitos de rutina.

Debido a estas limitaciones, en los últimos años se han estandarizado y aplicado técnicas de amplificación de ácidos nucleicos para la investigación de micoplasmas genitales¹⁷⁻²⁰ y la mayoría de los estudios clínicos y epidemiológicos en diferentes poblaciones se han realizado utilizando estos ensayos moleculares^{5,7,8,18-20}. Sin embargo, en nuestro medio, estas técnicas no han sido incorporadas a los laboratorios de diagnóstico, por lo cual no existen estudios de la prevalencia de estos microorganismos.

El objetivo de este trabajo fue investigar la prevalencia de infecciones por *M. genitalium*, a través de ensayos moleculares, en una población de mujeres sexualmente activas que asistieron a consulta de ginecología en centros de salud y correlacionar su presencia con manifestaciones clínicas.

Material y Método

Se realizó un estudio prospectivo, transversal y descriptivo para evaluar la prevalencia de *M. genitalium* en una población de mujeres sexualmente activas en zonas urbanas del Municipio de Maracaibo, estado Zulia, Venezuela.

El protocolo de investigación siguió los lineamientos éticos internacionales respetando los acuerdos de la Declaración de Helsinki en su revisión de octubre del año 2000 y fue aprobado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia. La participación voluntaria de las pacientes en este estudio fue autorizada a través de un documento de consentimiento informado, en el cual se les informó los objetivos de la investigación y se les garantizó confidencialidad y privacidad de los resultados obtenidos.

Selección de la población de estudio. Se evaluaron 172 pacientes del sexo femenino, sexualmente activas, en edades comprendidas entre 20 y 48 años, pertenecientes a clases sociales media alta (Estrato II) y media baja (Estrato III), de acuerdo a la escala de Graffar modificada²¹, que asistieron a consulta de ginecología en tres centros de salud del Municipio de Maracaibo, estado Zulia, Venezuela durante el periodo agosto 2006 - enero 2007. Se excluyeron pacientes con diagnóstico de infección por *Chlamydia trachomatis*, *virus herpes simplex (VHS-2)*, *virus papiloma humano (VPH)* y aquellas que habían recibido terapia antimicrobiana durante las últimas tres semanas. En la población no se detectaron casos de infección por *Neisseria gonorrhoeae* ni *Trichomonas vaginalis*.

Durante la evaluación clínica y ginecológica, las pacientes se clasificaron como sintomáticas y asintomáticas. El grupo sintomático incluyó aquellas pacientes que asistieron a consulta de ginecología con manifestaciones clínicas como secreción vaginal anormal, cervicitis, sangrado post-coital, disuria, o cualquier manifestación genito-urinaria. Se registró para cada paciente la manifestación clínica predominante, de acuerdo a criterios del médico especialista. El grupo de pacientes asintomáticas incluyó aquellas que asistieron a consulta ginecológica sin presentar manifestaciones clínicas.

Recolección de la muestra. Previa elaboración de la historia clínica y evaluación ginecológica, a todas las pacientes se les tomó un hisopado de la región endocervical, el cual se transportó en un tubo conteniendo 1 ml de tampón fosfato salino (PBS), pH 7,2. Las muestras se refrigeraron a -20 °C y se procesaron durante los tres primeros días de su recepción.

Extracción de ADN. Para la extracción de ADN se utilizó el procedimiento descrito previamente²². El hisopo fue presionado enérgicamente contra las paredes del tubo antes de descartarlo y el volumen total de muestra fue transferido a un tubo de 1,5 ml y se centrifugó a 14.000 x g. El sedimento se resuspendió en 500 µl de tampón TE (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA, pH 8) y después de este lavado, el sedimento se resuspendió en 400 µl de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 250 µg/ml de proteinasa K). Se incubó la muestra a 56 °C durante 2 horas. Los lisados fueron extraídos con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), precipitados con isopropanol y lavados con etanol 70%. El ADN se resuspendió en 30 µl de tampón TE. Se utilizó 5 µl de la muestra para ensayos de amplificación.

Detección de *M. genitalium* por reacción de polimerasa en cadena (RPC). Como ensayo preliminar se utilizó un kit de detección de Maxim Biotech, INC, USA (SP-10522). Este kit incluye oligonucleótidos dirigidos a una secuencia de ADN conservada del gen *16S rARN* (Acceso M24289), que permite amplificar un fragmento de 320 pb del genoma de microorganismos del género *Mycoplasma*. La mezcla de reacción y condiciones de amplificación por RPC se reprodujeron siguiendo instrucciones del proveedor. El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 8 minutos a 96 °C, seguidos de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por un minuto, alineamiento a 58 °C por 1 minuto y extensión a 72 °C por 1 minuto. Se hizo una extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Como control positivo, se utilizó el fragmento de ADN clonado en plásmido de la región conservada 16S ARNr que incluye el kit.

Para detectar el genoma de *M. genitalium* en las muestras clínicas se utilizaron secuencias de oligonucleótidos MG1F y MG2R, previamente publicadas^{17,23}, que permiten amplificar un fragmento de 282 pb del gen *MgPa* (codificante de una adhesina requerida para la fijación de *M. genitalium* a células epiteliales). La mezcla de reacción consistió en 10 µl de tampón Go taq ADN polimerasa 5X (Promega), 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada desoxirribonucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 25 pmoles de cada oligonucleótido, 0,25 µl de Taq ADN polimerasa 5U/µl (Promega) y 5 µl de muestra

de ADN para cada reacción. El programa de amplificación consistió en 8 minutos a 95 °C y 35 ciclos de amplificación de un minuto a 95 °C, un minuto a 55 °C, un minuto a 72 °C y un paso final de amplificación a 72 °C por 8 minutos.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador MJ Research PTC-100™. Los productos de RPC se analizaron en geles de agarosa al 1% y se utilizó tampón TBE para la corrida electroforética (Tris-Borato 89mM, EDTA 2mM pH 8). La corrida se llevó a cabo a 80v/cm por una hora. Los geles fueron

teñidos con bromuro de etidio, visualizados en transiluminador ultravioleta y fotografiados con sistema de fotodocumentación DigiDoc UVP.

Una muestra se consideró positiva cuando se obtuvo amplificación del fragmento de 282 pb en dos reacciones de RPC llevadas a cabo en dos momentos diferentes.

Análisis estadístico. Para el análisis estadístico se utilizó el software SPSS (versión 10) para Windows. A través del análisis descriptivo se calcularon frecuencias con sus respectivos porcentajes para cada una de las variables. La asociación de infección por *M. genitalium* con manifestaciones clínicas particulares y edad de las pacientes se calculó a través de tablas de contingencia y χ^2 . Se estableció un nivel de significancia de $p < 0,05$.

Resultados

Este estudio permitió determinar la prevalencia de infecciones por *M. genitalium* en 172 mujeres que asistieron a tres centros de salud de zonas urbanas del municipio Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. El total de pacientes que asistió a consulta durante el período agosto 2006 - enero 2007 fue de 278. Sólo 209 pacientes aceptaron su participación en el estudio. Durante la evaluación, se excluyeron ocho pacientes con diagnóstico de infección por VPH, 12 pacientes con *C. trachomatis* y 17 pacientes que recibieron terapia antimicrobiana tres semanas previas al estudio. No se detectaron casos de infección por *N. gonorrhoeae* ni *T. vaginalis*. El promedio de edad de las pacientes fue de $31,4 \pm 6,5$. De las 172 pacientes, 74 (43%) exhibieron manifestaciones clínicas y 98 (57%) fueron asintomáticas al momento de ejecutar el estudio.

En el primer ensayo, se logró amplificar el fragmento esperado de 320 pb del 16S rARN en 21 de las 172 muestras (12,2%). Estas muestras positivas correspondían a 11/74 pacientes sintomáticas y 10/98 pacientes asintomáticas, resultando en una prevalencia de *Mycoplasma* sp de 14,8 y 10,2%, respectivamente.

Al aplicar el segundo ensayo, basado en la amplificación del gen *MgPa*, se definió que sólo 13 de las 21 (61,9%) muestras positivas para el ensayo género-específico, contenían el genoma de *M. genitalium*. En la Figura 1 se ilustra el patrón de amplificación de nueve muestras, ocho de las cuales fueron positivas para el ensayo 16S rARN y sólo tres resultaron positivas para *M. genitalium*.

Este análisis permitió estimar una prevalencia de *M. genitalium* en la población de 7,5% (Tabla 1). En este estudio no se llevó a cabo la confirmación de la identi-

Figura 1. Ensayos de amplificación por RPC de genes 16S rARN (superior) y *MgPa* (inferior). M: Marcador de peso molecular; C-: control negativo; C+: control positivo; Carriles 1 al 9: muestras de 9 de las pacientes evaluadas, 8 de ellas, positivas para el ensayo 16S rARN (género específico), de las cuales sólo tres muestran el producto específico de *M. genitalium*.

Tabla 1. Prevalencia de infección por *Mycoplasma genitalium* de acuerdo presencia o no de síntomas y edad de las pacientes

Edad	Sintomáticas		Asintomáticas		Total	
	N° de casos	Casos + <i>M. genitalium</i> (%) a	N° de casos	Casos + <i>M. genitalium</i> (%) b	Casos + <i>M. genitalium</i>	PrevT % c
20-30 (n: 74)	32	4 (12,5%)	42	1 (2,3%)	5	6,7
31-40 (n: 61)	25	4 (16,0%)	36	2 (5,5%)	6	9,8
> 40 (n: 37)	17	1 (5,8%)	20	1 (5,0%)	2	5,4
Total (n: 172)	74	9 (12,1%)	98	4 (4,1%)	13	7,5

+: Casos positivos para ambos ensayos de amplificación.
a y b: Porcentaje de casos positivos de *M. genitalium* calculados con referencia a cada grupo etario dentro de grupos sintomático y asintomático, respectivamente.
c. PrevT: Prevalencia de *M. genitalium* calculada con relación a número de participantes de cada grupo etario.

dad de especies de *Mycoplasma* detectados en las ocho muestras restantes (38,1%), positivas para el ensayo *16S rARN*. Estos casos se ubicaron dentro del grupo de pacientes asintomáticas.

Mycoplasma genitalium fue detectado en nueve de las 74 pacientes que exhibieron manifestaciones clínicas (12,1%) y cuatro de las 98 pacientes asintomáticas (4,1%) (Tabla 1), evidenciándose una diferencia significativa entre ambos grupos ($p: 0,047$). La mayor prevalencia de infecciones por *M. genitalium* se registró en el grupo etario de 31-40 años, pero no se encontró diferencia significativa al correlacionar la presencia de *M. genitalium* con la edad de las pacientes ($p > 0,05$).

Entre las manifestaciones clínicas registradas con mayor frecuencia en esta población se destacaron cervicitis (39,2%), disuria (27,0%) y secreción mucopurulenta (16,2%) (Tabla 2). El mayor número de casos de *M. genitalium* fue detectado en pacientes con cervicitis (17,2%) y con secreción mucopurulenta (16,6%); sin embargo, no se encontró asociación significativa de infección por *M. genitalium* con alguna manifestación clínica en particular.

Discusión

Las dificultades para el diagnóstico de infecciones por *M. genitalium*, ha limitado el conocimiento de la epidemiología de este microorganismo en nuestro medio, por lo cual se ha realizado el presente estudio, utilizando una estrategia de diagnóstico molecular que podría ser de gran valor como herramienta para la investigación de infecciones por *M. genitalium* y permitiría evaluar la prevalencia de este patógeno en poblaciones a gran escala.

La prevalencia de infecciones por *M. genitalium* encontrada en este estudio es equivalente a la reportada por varios autores, ubicándose en el rango de 1 a 10% en la mayoría de las poblaciones²⁴⁻²⁷. *Mycoplasma genitalium* es detectado con mayor frecuencia en poblaciones con factores de riesgo²⁸, alcanzando cifras de 20 a 30% en trabajadoras sexuales²⁹.

La prevalencia de 7,5% resultó superior a los resultados esperados para esta población perteneciente a clases sociales media alta y media baja²¹, que incluye mujeres con características cognitivo-perceptuales en las cuales se presume auto-eficacia para asumir conductas preventivas y favorecedoras con respecto a su salud y con condiciones socio-económicas que le permiten acceso permanente a los servicios de salud reproductiva. Lamentablemente no se pudo establecer asociación de la infección con factores de riesgo, debido a que sólo un número reducido de pacientes acce-

Tabla 2. *Mycoplasma genitalium* y manifestaciones clínicas individuales

Signos y síntomas	Pacientes		Casos + <i>Mycoplasma genitalium</i>		
	n	%	n	% ^a	% ^b
Cervicitis	29	39,2	5	17,2	6,7
Secreción mucopurulenta	12	16,2	2	16,6	2,7
Disuria	20	27,0	1	5,0	1,3
Sangrado post-coital	9	12,1	0	0	0
Enfermedad inflamatoria pélvica	4	5,4	1	25,0	1,3
Total	74	100	9	12,1	12,1

^a: porcentaje calculado en relación a número de pacientes presentando síntoma especificado
^b: porcentaje calculado en relación a número total de pacientes sintomáticas

dió a llenar un cuestionario exploratorio para evaluar de manera sistemática y objetiva aspectos relacionados con sus hábitos sexuales. Algunos autores señalan que el reporte voluntario del comportamiento sexual se ha convertido en un pobre predictor del riesgo de infección, al no garantizar la fidelidad de la información suministrada, motivado principalmente por la estigmatización de las infecciones de transmisión sexual³⁰.

Un hallazgo relevante en este trabajo fue la ausencia de asociación de *M. genitalium* con signos y síntomas particulares; sin embargo, la asociación significativa encontrada entre *M. genitalium* y la presencia de manifestaciones clínicas en general, representa nuevas evidencias que apoya la hipótesis sobre la potencial contribución de *M. genitalium* a morbilidades del tracto urogenital^{3-8,25,27}.

En un trabajo reciente, estos síntomas fueron asociados fuertemente con especies de *Ureaplasma*, acompañado de una baja prevalencia de *M. genitalium*; sin embargo, en ese estudio, los autores reportaron que la condición subóptima de amplificación para este microorganismo podría ser responsable de su baja frecuencia de detección³¹.

M. genitalium parece localizarse en el extra e intracelular en presencia de una infección moderada y predominantemente en el intracelular en los casos de infección grave, sugiriendo una invasión masiva de *Mycoplasma* acompañado de replicación intracelular y persistencia^{32,33}. De acuerdo a este patrón de infección, sería recomendable detectar tempranamente la infección y tratarla en estadios tempranos, debido a que la persistencia intracelular podría dificultar el éxito de la terapia antimicrobiana.

La mayoría de mujeres con sintomatología urogenital son tratadas empíricamente contra *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis*, de acuerdo a lineamientos para el tra-

tamiento de enfermedades de transmisión sexual¹²; sin embargo, deberían ser evaluados esquemas terapéuticos, que consideren las evidencias acumuladas hasta el momento a través de múltiples reportes, incluyendo los resultados de este trabajo, que sugieren una potencial contribución de *M. genitalium* al desarrollo de patologías del tracto urogenital no gonocócicas. Se debería tomar en cuenta que algunos antimicrobianos prescritos, tales como penicilinas y cefalosporinas, actúan a nivel de la pared celular, siendo inefectivos contra *M. genitalium*.

En conclusión, *M. genitalium* debería ser considerado un potencial patógeno del tracto urogenital cuando es detectado en ausencia de *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis*. Dada la alta prevalencia y asociación encontrada entre *M. genitalium* y manifestaciones clínicas urogenitales en este reporte y otros trabajos, es recomendable aplicar estrategias diagnósticas para investigar el significado clínico de estos microorganismos y reevaluar esquemas terapéuticos contra infecciones no gonocócicas y no clamidiales.

Agradecimientos. A las pacientes y médicos especialistas que participaron en el estudio. Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia por el cofinanciamiento de esta investigación (Programa N° CC-0229-07). A la Oficina de Planificación del Sector Universitario (OPSU) por su contribución en el fortalecimiento del laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investiga-

ciones Endocrino-Metabólicas Dr. Félix Gómez de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia.

Resumen

Diversos estudios demuestran una asociación entre *Mycoplasma genitalium* y patologías urogenitales. El objetivo de este trabajo fue investigar la prevalencia de infecciones por *M. genitalium* en pacientes atendidas en clínicas privadas (n = 172). Se utilizaron ensayos de amplificación de genes *16S rARN* y *MgPa*. La prevalencia de *M. genitalium* en esta población fue 7,5%. *Mycoplasma genitalium* fue detectado en 12,1 y 4,1% de las pacientes sintomáticas y asintomáticas, respectivamente (p = 0,047). La infección se diagnosticó en pacientes con cervicitis (17,2%) y con secreción mucopurulenta (16,6%) y la mayor prevalencia de infecciones se registró en el grupo etario de 31 a 40 años. No se encontró asociación significativa entre la presencia de *M. genitalium* y manifestaciones clínicas individuales o edad de las pacientes (p > 0,05). La alta prevalencia de infecciones por *M. genitalium*, principalmente en pacientes con manifestaciones clínicas demostrada en este estudio, demanda la aplicación de estrategias diagnósticas en la población para investigar el significado clínico de estos microorganismos y reevaluar esquemas terapéuticos contra infecciones no gonocócicas y no clamidiales.

Referencias

- 1.- Razin S, Yagov D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas. Microbiol Mol Biol Rev 1998; 62: 1094-156.
- 2.- Taylor-Robinson D. Infections due to species of Mycoplasma and Ureaplasma: an update. Clin Infect Dis 1996; 23: 671-84.
- 3.- Horner P, Thomas B, Gilroy C B, Egger M, Taylor-Robinson D. Role of *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* in acute and chronic nongonococcal urethritis. Clin Infect Dis 2001; 32: 995-1003.
- 4.- Pepin J, Sobela F, Desandes S, Alary M, Wegner K, Khonde N, et al. Etiology of urethral discharge in West Africa: the role of *Mycoplasma genitalium* and *Trichomonas vaginalis*. Bull. WHO 2001; 79: 118-26.
- 5.- Falk J, Fredlund H, Hensen J S. Signs and symptoms of urethritis and cervicitis among women with or without *Mycoplasma genitalium* or *Chlamydia trachomatis* infection. Sex Transm Infect 2005; 81: 73-8.
- 6.- Schwartz M A, Hooton T M. Etiology of non-gonococcal non-chlamydial urethritis. Dermatol Clin 1998; 16: 727-33.
- 7.- Haggerty C I, Hillier S L, Bass D C, Ness R B. Bacterial vaginosis and anaerobic bacteria are associated with endometritis. Clin Infect Dis 2004; 39: 990-95.
- 8.- Haggerty C I, Totten P A, Astete S G, Ness R B. *Mycoplasma genitalium* among women with non-gonococcal, non-chlamydial pelvic inflammatory disease. Infect Dis Obstet Gynecol 2006; 2006: 1-5.
- 9.- Cates W Jr, Wasserheit J N. Genital chlamydial infections: epidemiology and reproductive sequelae. Am J Obstet Gynecol 1991; 164: 1771-81.
- 10.- Roberts T E, Robinson S, Barton P M, Bryan S, McCarthy A, Macleod J, et al. Cost effectiveness of home based population screening for *Chlamydia trachomatis* in the UK: economic evaluation of Chlamydia screening studies (ClaSS) project. Br Med J 2007; 335: 291-97.
- 11.- Cates W, Rolfs R T, Aral S O. Sexually transmitted diseases, pelvic inflammation
- 12.- Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines. MMWR Recomm Rep 2006; 55: 1-94. Erratum in MMWR Recomm Rep 2006; 15: 55: 997.
- 13.- Monif G R, Welkos S L, Baer H, Thompson R J. Cul-de-sac isolates from patients with endometritis-salpingitis-peritonitis and gonococcal endocervicitis. American J Obstet Gynecol 1976; 126: 158-61.
- 14.- Fraser C M, Gocayne J D, White O, Adams M D, Clayton R A, Fleischmann R D, et al. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. Science 1995; 270: 397-403.
- 15.- Himmelreich R, Hilbert H, Plagens H, Pirkel E, Li B-C, Herrmann R. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. Nucleic Acids Res 1996; 24: 4420-49.
- 16.- Hamasuna R, Osada Y, Jensen JS. Isolation of *Mycoplasma genitalium* from first-void

- urine specimens by co-culture with Vero Cells. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 847-50.
- 17.- Stellrecht K A, Woron A M, Mishrik G, Venezia R A. Comparison of Multiplex PCR assay with culture for detection of genital Mycoplasmas. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1528-33.
 - 18.- Jensen J S, Borre M B, Dohn B. Detection of *Mycoplasma genitalium* by PCR amplification of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 261-6.
 - 19.- Baseman J B, Cagle M, Korte J, Herrera C, Rasmussen W G, Baseman J G, et al. Diagnostic assessment of *Mycoplasma genitalium* in culture-positive women. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 203-11.
 - 20.- Totten P A, Schwartz K E, Sjöström K E, Kenny G E, Handsfield H H, Weiss J B, et al. Association of *Mycoplasma genitalium* with nongonococcal urethritis in heterosexual men. *J Infect Dis* 2001; 183: 269-76.
 - 21.- Méndez-Castellano H, De Méndez M C. Estratificación social y biología humana: método de Graffar modificado. *Arch Ven Pueric Pediatr* 1986; 49: 93-104.
 - 22.- Arráiz N, Ginestre M, Perozo A, Castellano M, Urdaneta B, García M. Diagnóstico molecular y prevalencia de infecciones por *Chlamydia trachomatis* en pacientes sintomáticas y asintomáticas de una población del estado Zulia, Venezuela. *Rev Chil Infect* 2007; 24: 48-52.
 - 23.- Skov-Jensen J, Uldum S A, Sondergaard-Andersen J, Vuust J, Lind K. Polymerase chain reaction for the detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 46-50.
 - 24.- Manhart L E, Holmes K K, Hughes J P, Houston L S, Totten P A. *Mycoplasma genitalium* among young adults in the United States: An emerging sexually transmitted infection. *Am J Public Health* 2007; 97: 118-25.
 - 25.- Anagnrius C, Loré B, Jenen J S. *Mycoplasma genitalium*: prevalence, clinical significance and transmisión. *Sex Transm Infect* 2005; 81: 458-62.
 - 26.- Andersen B, Sokolowski I, Østergaard L, Møller K, Olesen F, Jensen J S. *Mycoplasma genitalium*: prevalence and behavioral risk factors in the general population. *Sex Transm Infect* 2007; 83: 237-41.
 - 27.- Manhart L E, Crithlow C W, Holmes K K, Dutro S M, Eschenbach D A, Stevens C E, et al. Mucopurulent cervicitis and *Mycoplasma genitalium*. *J Infect Dis* 2003; 187: 650-7.
 - 28.- Tosh A K, Van Der Pol B, Fortenberry J D, Williams J A, Katz B P, Batteiger B E, et al. *Mycoplasma genitalium* among adolescent women and their partners. *J Adolesc Health* 2007; 40: 412-7.
 - 29.- Cohen C R, Nosek M, Meier A, Astete S G, Iverson-Cabral S, Mugo N R, et al. *Mycoplasma genitalium* infection and persistence in a cohort of female sex workers in Nairobi, Kenya. *Sex Transm Dis* 2007; 34: 274-9.
 - 30.- Gutiérrez J P, Bertozzi S M, Conde-Glez C J, Sánchez-Alemán M A. Risk behaviour of 15-21 years old in Mexico lead to a high prevalence of sexually transmitted infections: results of a survey in disadvantaged urban areas. *BMC Public Health* 2006; 6:49-59.
 - 31.- Schlicht M J, Lovrich S D, Sartin J S, Karpinsky P, Clister S M, Agger W A. High prevalence of genital Mycoplasmas among sexually active young adults with urethritis or cervicitis symptoms in La Crosse, Wisconsin. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4636-40.
 - 32.- Blaylock M W, Musatovova O, Baseman J G, Baseman J B. Determination of infectious load of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples of human vaginal cells. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 746-52.
 - 33.- Dallo S F, Baseman J B. Intracellular DNA replication and long-term survival of pathogenic mycoplasmas. *Microb Pathog* 2000; 29: 301-9.