

PCR múltiplex para el diagnóstico de microorganismos atípicos transmitidos sexualmente

Marcos R. Escobedo-Guerra¹, Marcela López-Hurtado¹, Rodrigo Gutiérrez-Trujillo¹,
Abraham D. Bustos-López² y Fernando M. Guerra-Infante^{1*}

¹Departamento de Infectología Perinatal, Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinoza de los Reyes; ²Laboratorio de Pruebas Especiales, Centro Médico Naval. Ciudad de México, México

Resumen

Antecedentes: Las infecciones de transmisión sexual son un problema de salud pública mundial. El análisis rutinario incluye solo pruebas microbiológicas y serológicas para el diagnóstico de patógenos. Los microorganismos atípicos como *Chlamydia trachomatis* y micoplasmas no son identificados debido a los requerimientos. Además, no es incluida *Gardnerella vaginalis*, aunque se asocia a la vaginosis bacteriana. **Objetivo:** Desarrollar una PCR múltiplex para el diagnóstico de *C. trachomatis*, micoplasmas y *G. vaginalis*. **Método:** Se estandarizó la PCR múltiplex utilizando oligonucleótidos para *C. trachomatis* (gen *ompA*, *orf6* plasmídico), *Mycoplasma/Ureaplasma* y *G. vaginalis* (genes *rRNA16s*). **Resultados:** Se estandarizaron pruebas de PCR múltiplex para los microorganismos estudiados, optimizándose las concentraciones y condiciones de las reacciones múltiplex. Se obtuvieron PCR dúplex para *C. trachomatis* (*ompA*, *orf6*), *Chlamydia/Gardnerella* y *Chlamydia/micoplasmas* y tríplex para *Chlamydia/Mycoplasma/Ureaplasma*. También un cuádruplex para *Chlamydia/Mycoplasma/Ureaplasma/Gardnerella*. Los resultados fueron verificados por PCR e hibridación automática (*HybriSpot 12*) y análisis *in silico*. **Conclusión:** Se desarrollaron pruebas de PCR múltiplex con una alta sensibilidad y especificidad para la identificación de *C. trachomatis*, micoplasmas y *G. vaginalis*.

Palabras clave: PCR múltiplex. *Chlamydia trachomatis*. *Mycoplasma* spp. *Ureaplasma* spp. *Gardnerella vaginalis*. Infección de transmisión sexual.

Multiplex PCR testing for the atypical microorganisms diagnosis sexually transmitted

Abstract

Background: Sexually transmitted infections are a global public health problem. Routine analysis includes microbiological and serological tests for the diagnosis of pathogens. Atypical microorganisms such as *Chlamydia trachomatis* and mycoplasmas are not determined due to the requirements for their identification. Furthermore, *Gardnerella vaginalis* is not included despite being associated with bacterial vaginosis. **Objective:** To develop a multiplex PCR to diagnose *Chlamydia*, mycoplasmas, and *Gardnerella*. **Method:** Standardization of multiplex PCR tests was carried out using oligonucleotides for the identification of *Chlamydia* (*ompA* gene, plasmid *orf6*), *Mycoplasma/Ureaplasma* and *Gardnerella* (*rRNA16s* genes). **Results:** Multiplex PCR tests were standardized for the microorganisms studied, optimizing the concentrations and conditions of the multiplex reactions.

*Correspondencia:

Fernando M. Guerra-Infante
E-mail: fguerra_96@yahoo.com

Fecha de recepción: 02-10-2023
Fecha de aceptación: 02-11-2023
DOI: 10.24875/PER.23000024

Disponible en internet: 15-02-2024
Perinatol Reprod Hum. 2023;37(3):108-114
www.perinatologia.mx

0187-5337/© 2023. Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinoza de los Reyes. Publicado por Permanyer. Este es un artículo open access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Duplex PCR was obtained for *Chlamydia* (*ompA*, *orf6*), *Chlamydia/Gardnerella*, and *Chlamydia/mycoplasmas*, and triplex PCR for *Chlamydia/mycoplasmas*. Also, a quadruplex for *Chlamydia*, *Mycoplasma/Ureaplasma* and *Gardnerella*. PCR and automatic hybridization verified the results obtained (HybriSpot 12) and *in silico* analysis. **Conclusion:** Multiplex PCR tests with high sensitivity and specificity were developed to identify *C. trachomatis*, *mycoplasmas*, and *G. vaginalis*.

Keywords: Multiplex PCR. *Chlamydia trachomatis*. *Mycoplasma* spp. *Ureaplasma* spp. *Gardnerella vaginalis*. Sexually transmitted infection.

Introducción

El término infección de transmisión sexual (ITS) hace referencia a una infección que se transmite por la sangre, el semen, los fluidos vaginales u otros líquidos corporales durante el sexo oral, anal o genital con una pareja infectada¹. El término enfermedad de transmisión sexual (ETS) hace referencia a una enfermedad que se ha desarrollado a partir de una ITS. Algunos ejemplos son el VIH, la sífilis, el papiloma, la gonorrea, la clamidiasis o la hepatitis, entre otras¹.

La implementación de métodos moleculares para la detección de microorganismos dio una nueva perspectiva en el diagnóstico mediante pruebas basadas en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La Organización Mundial de la Salud ha puesto énfasis en desarrollar métodos de diagnóstico rápidos, sensibles y específicos, para aplicar un tratamiento rápido y eficaz, por lo que se ha considerado la PCR como una técnica confiable para el análisis de enfermedades².

El uso de métodos moleculares como la PCR se considera de bajo costo en comparación con otras técnicas convencionales utilizadas para la detección de estos patógenos y cuyos resultados han demostrado no ser tan eficaces^{3,4}. Hoy en día, los centros de salud, hospitales e institutos del Sistema Nacional de Salud basan su diagnóstico de ITS en la microbiología convencional apoyado por equipos automatizados como el Sistema Vitek2, que son relativamente costosos y requieren hasta dos o tres días de incubación para obtener resultados⁵. Las pruebas de detección microbiológica convencional para bacterias se consideran los métodos de referencia, pero tienen una utilidad limitada en casos subclínicos o crónicos debido a su menor sensibilidad e ineficacia en microorganismos no cultivables⁶. Los ensayos serológicos como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), la prueba de anticuerpos fluorescentes indirectos (IFA) y los ensayos de inmunotransferencia son sensibles, pero adolecen del problema del costo incurrido, la reactividad cruzada y la incapacidad de distinguir entre infección presente o pasada⁷. Sin embargo, las técnicas de diagnóstico molecular, como la PCR convencional

y los ensayos de PCR en tiempo real, ofrecen pruebas de diagnóstico sensibles y específicas para la detección de patógenos^{3,8}.

De las variantes de la PCR la más utilizada para la detección e identificación específica de microorganismos es la PCR múltiple, en donde se amplifican dos o más segmentos de ADN blanco utilizando iniciadores diseñados que mantienen una alta sensibilidad y especificidad en la detección génica de los patógenos⁹. Sin embargo, en México no se utiliza esta técnica molecular para la detección simultánea de patógenos en una sola PCR, solo existen reportes de trabajos con PCR simple y PCR anidada para la detección individual de los patógenos. Recientemente, los ensayos convencionales de PCR se han utilizado ampliamente para la detección de microorganismos denominados atípicos, como *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma* spp. y *Ureaplasma* spp., entre otros^{10,11}. Así mismo, estas pruebas se han implementado en el diagnóstico de patógenos que pueden ser identificados por pruebas microbiológicas convencionales como *Neisseria*, *Haemophilus ducreyi*, etc. Además, se ha demeritado el rol de *Gardnerella vaginalis* en afecciones como la vaginosis bacteriana a pesar de haber estudios que la relacionan directamente en la implantación de infecciones por *Neisseria gonorrhoeae* y *C. trachomatis*¹². Actualmente, las compañías biotecnológicas ofrecen diferentes alternativas para el diagnóstico tanto de manera individual como en paneles de enfermedades; estas nuevas metodologías nos permiten identificar desde 6 hasta 11 agentes etiológicos en el caso de marcas como Seegene e HybrisSpot 12 respectivamente, en donde se incluyen tanto bacterias, como virus y protozoos. Sin embargo, la implementación de las nuevas tecnologías de multidiagnóstico por biología molecular que se encuentran en el mercado son excesivamente costosas y en ocasiones insostenibles por el número de pruebas solicitadas.

El desarrollo de PCR múltiple por su rapidez, sensibilidad y especificidad se transforma en una herramienta para el uso en epidemiológico, de control y prevención de enfermedades³. Es por ello que numerosos grupos de trabajo han desarrollado sus propias pruebas

Tabla 1. Generalidades de los oligonucleótidos seleccionados para la PCR

Microorganismo	Iniciadores	Sitio	Referencia
<i>Chlamydia trachomatis</i>	CT3 CT4	Cromosoma Gen <i>ompA</i>	Jian-Hong et al., 2010 ¹³
<i>Chlamydia trachomatis</i>	CDS6 CDS6	Plásmido <i>orf6</i>	Escobedo-Guerra et al. (datos no publicados)
<i>Mycoplasma</i> spp. <i>Ureaplasma</i> spp.	GP01 MGS0	Cromosoma Gen <i>rRNA16s</i>	van Kuppeveld et al., 1992 ¹⁴
<i>Gardnerella vaginalis</i>	GV16sF GV16sR	Cromosoma Gen <i>rRNA16s</i>	Pillay et al., 2020 ¹⁵

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

diagnósticas para cubrir las necesidades de cada hospital o centro de salud para una rápida identificación y diferenciación de los patógenos y así ofrecer un tratamiento inmediato. Ante este panorama, el propósito de este estudio es el de desarrollar pruebas de PCR múltiple para el diagnóstico de microorganismos atípicos. Con base en lo anterior, se propone la elaboración de pruebas de PCR de tipo simple o múltiple para satisfacer las necesidades del instituto. La finalidad es ofrecer una prueba diagnóstica alcanzable pero que mantenga la sensibilidad y especificidad que tienen los métodos moleculares.

Materiales y métodos

Extracción de ADN genómico

La extracción del ADN total de las muestras endocervicales se realizó utilizando el reactivo de purificación Tripure™ de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Boehringer Mannheim, Ingelheim, Alemania). Así mismo, el ADN plasmídico se aisló con el sistema QIAprep Miniprep Kit (Qiagen™, Hilden, Alemania).

Identificación individual de *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma* spp., *Ureaplasma* spp. y *Gardnerella vaginalis* por PCR

La identificación de los patógenos asociados a las ETS (Tabla 1) se realizó mediante la prueba de la PCR convencional dirigida a diferentes genes utilizando los cebadores sintetizados por IDT® (Coralville, IA, EE.UU.). Cabe destacar que para el caso de *C. trachomatis* se consideraron dos dianas génicas, el gen *ompA* y el *orf6* plasmídico, debido al bajo número de bacterias y para aumentar la sensibilidad de la prueba de PCR para este

microorganismo. Por otra parte, para micoplasmas y *G. vaginalis* se recurrió a iniciadores que han sido reportados como altamente sensibles y específicos. La mezcla de reacción para las pruebas de PCR consistió en TaqPCR Master Mix Kit (Qiagen™), 10 pM de cada iniciador y 5 µl del ADN. Para cada ensayo de PCR se utilizó como control positivo el ADN de cepas cada uno de los microorganismos estudiados y como control negativo el ADN de células HeLa. La amplificación se realizó en un termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.™, Hercules, CA, EE.UU.) con una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos (95 °C/45 s, 59 °C/45 s y 72 °C/1 min) y extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Identificación múltiple de *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma* spp., *Ureaplasma* spp. y *Gardnerella vaginalis* por PCR

De acuerdo con las características de los iniciadores para cada uno de los microorganismos estudiados (Tabla 2) se estableció un protocolo para el ensayo del sistema de PCR múltiple. De manera inicial se realizaron pruebas dúplex y posteriormente tríplex para la identificación de los diversos patógenos contemplados (Tabla 3). La mezcla de reacción para las pruebas de PCR consistió en TaqPCR Master Mix Kit (Qiagen™), 10 pM de cada iniciador y 5 µl del ADN. Para cada uno de los ensayos se utilizó como control positivo el ADN de cada una de las cepas de los microorganismos estudiados y como control negativo el ADN de células HeLa. La amplificación se realizó en un termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.™, Hercules, CA, EE.UU.) con una desnaturalización inicial a 95 °C durante

Tabla 2. Características de los oligonucleótidos seleccionados para la PCR múltiple

Microorganismo	T _m °C	Amplificación pb	Secuencia 5'-3'
<i>Chlamydia trachomatis ompA</i>	55	460	ACTTTGTTTTGACCGTGTTTG GATTGAGCGTATTGGAAGAAGC
<i>Chlamydia trachomatis orf6</i>	58	303	GCAAAATAAAAGAAAAGTGAGGGACG TCAGCCTTGAAAACATGTCT
<i>Mycoplasma</i> spp. <i>Ureaplasma</i> spp.	59	715	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC
<i>Gardnerella vaginalis</i>	54	1300	TTCGATTCTGGCTCAGG CCATCCAAAAGGGTTAGGC

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

Tabla 3. Esquema de trabajo para el análisis del desempeño de la PCR múltiple

Dúplex	Tríplex	Cuádruplex
<i>C. trachomatis ompA</i>	<i>C. trachomatis ompA</i>	<i>C. trachomatis ompA</i>
<i>C. trachomatis orf6</i>	<i>C. trachomatis orf6</i>	<i>C. trachomatis orf6</i>
<i>C. trachomatis ompA</i>	<i>C. trachomatis orf6</i>	<i>C. trachomatis orf6</i>
<i>Mycoplasma/Ureaplasma</i>	<i>Mycoplasma/Ureaplasma</i>	<i>Mycoplasma/Ureaplasma</i>
<i>C. trachomatis ompA</i>	<i>Mycoplasma/Ureaplasma</i>	<i>Mycoplasma/Ureaplasma</i>
<i>G. vaginalis</i>	<i>Ureaplasma</i>	<i>G. vaginalis</i>
<i>Mycoplasma/Ureaplasma</i>		<i>G. vaginalis</i>
<i>C. trachomatis orf6</i>		
<i>Mycoplasma/Ureaplasma</i>		
<i>G. vaginalis</i>		

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

Así mismo, los productos de PCR de cada uno de los microorganismos identificados se purificaron con el sistema NucleoSpin (Macherey-Nagel™, Düren, Alemania) y se enviaron al Instituto de Biología (Universidad Nacional Autónoma de México) para su secuenciación mediante el secuenciador ABI PRISM (Applied Biosystems, Waltham, MA, EE.UU.). Las secuencias obtenidas se analizaron con el software de Chromas (Technelysum Pty Ltd., South Brisbane QLD, Australia), identificado por BLASTn (NCBI, MD, EE.UU.)^{16,17} y alineado con el software ClustalW¹⁸ y Multalin (versión 5.4.1, alineación de secuencia múltiple con agrupamiento jerárquico, Francia)¹⁹.

5 minutos, seguido de 30 ciclos (95 °C/45 s, 59 °C/45 s y 72 °C/1 min) y extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Validación de resultados

Los resultados obtenidos de las pruebas de PCR simple y múltiple fueron validados mediante el análisis en paralelo de algunas muestras con el equipo HybriSpot 12 (Master Diagnostica, Vitro Group, Sevilla, España) y por secuenciación de los productos de amplificación.

El ADN obtenido de las muestras fue procesado en el equipo HybriSpot 12 de acuerdo con las indicaciones del fabricante. El equipo HybriSpot 12 es un sistema automatizado de PCR e hibridación que permite la identificación múltiple de patógenos asociados a ITS como *C. trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Haemophilus ducreyi*, *Ureaplasma* spp., *N. gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, herpes virus I, herpes virus II y *Trichomonas vaginalis*.

Resultados

PCR simple

Se obtuvieron los productos esperados de la amplificación de cada uno de los genes de los microorganismos analizados y que correspondieron a los resultados reportados (Tabla 1). Los productos de amplificación fueron secuenciados y el análisis *in silico* demostró su homología y alineación a las secuencias de *C. trachomatis* (gen *ompA* cromosómico, *orf6* plasmídico), *Mycoplasma* spp. (gen *rRNA16s*), *Ureaplasma* spp. (gen *rRNA16s*) y *G. vaginalis* (gen *rRNA16s*) reportadas en el GenBank (*National Library of Medicine, National Center of Biotechnology Information*). Datos no publicados.

PCR múltiple

De acuerdo con el esquema propuesto se realizaron diferentes pruebas para la realización de la PCR múltiple (Tabla 3). Durante el desarrollo de las pruebas se

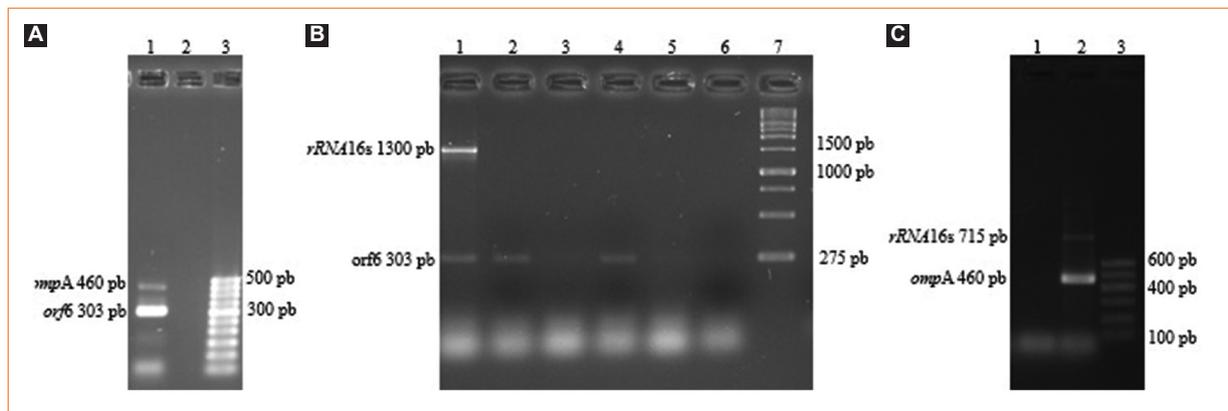


Figura 1. Desarrollo electroforético de las PCR dúplex para *Chlamydia trachomatis*. **A:** se observa la amplificación del *orf6* y del gen *ompA* con amplicones de 303 y 460 pb respectivamente; en el pozo 1, amplificación de 100 ng de ADN de *C. trachomatis*; en el 2, control negativo, y en el 3, marcador de tamaño molecular. **B:** se muestra el desarrollo electroforético del gen *orf6* de *C. trachomatis* y del gen *rDNA16s* de *G. vaginalis* con amplicones de 303 y 1,300 pb respectivamente. En el pozo 1, amplificación de 100 ng de ADN de *C. trachomatis* y *G. vaginalis*; del 2 al 5, muestras clínicas; en el 6, control negativo, y en el 7, marcador de tamaño molecular. **C:** se muestra el desarrollo electroforético del gen *ompA* de *C. trachomatis* y del gen *rRNA16s* de *Mycoplasma/Ureaplasma* con amplicones de 460 y 715 pb respectivamente. En el pozo 1, amplificación de 100 ng de ADN de *C. trachomatis* y *Mycoplasma hominis*; en el 2, control negativo, y en el 3, marcador de tamaño molecular. PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

observó que la PCR dúplex para *C. trachomatis* con los iniciadores para el gen *ompA* y el *orf6* plasmídico fueron satisfactorias. También se obtuvieron resultados para el dúplex de *C. trachomatis* (*orf6*) con *G. vaginalis* y *C. trachomatis* (gen *ompA*) con *Mycoplasma/Ureaplasma* (Fig. 1). Así mismo, se obtuvieron resultados limitados en la PCR dúplex tanto de *C. trachomatis* (*orf6*) con *Mycoplasma/Ureaplasma* y de *Mycoplasma/Ureaplasma* con *G. vaginalis*.

Posteriormente, con base en los resultados anteriores se realizó la PCR tríplex para *C. trachomatis* (gen *ompA* y *orf6* plasmídico) y *Mycoplasma/Ureaplasma* (gen *rRNA16s*) obteniéndose amplificación de los tres sitios génicos analizados (Fig. 2). Así mismo, se prosiguió a implementar una PCR cuádruplex, en la cual se utilizaron los oligonucleótidos para la detección de *C. trachomatis*, *Mycoplasma/Ureaplasma* y *G. vaginalis* con resultados satisfactorios (Fig. 3). Cabe señalar que en estas dos fases de la investigación además de incluir los controles positivos para cada uno de los microorganismos estudiados se utilizaron muestras clínicas para determinar la sensibilidad de la PCR múltiplex.

Discusión

El objetivo más importante del diagnóstico clínico es el de obtener resultados veraces y rápidos que repercutan

de manera directa en la calidad de vida del paciente^{4,6}. Desafortunadamente, el sistema de salud no posee las herramientas adecuadas para cubrir estas necesidades, además de que el diagnóstico de microorganismos atípicos como *C. trachomatis* y micoplasmas no se realiza de manera sistemática y en el caso de *G. vaginalis* no se considera como patógeno primario^{10,12}.

En cuanto a *C. trachomatis* y micoplasmas, los métodos utilizados en los laboratorios requieren de personal calificado e infraestructura especializada. Afortunadamente, la inclusión de las técnicas de biología molecular en el diagnóstico de estos microorganismos ha permitido su identificación oportuna y un tratamiento adecuado^{5,6}. Sin embargo, estos métodos moleculares representan un gran costo para los servicios de salud como para ser considerados como ensayos de rutina para los pacientes que asisten o ingresan a la clínicas u hospitales.

En esta investigación se analizaron las posibilidades de implementar pruebas de PCR dúplex, tríplex y posiblemente cuádruplex con las dificultades técnicas que se tienen que sortear. El establecimiento de pruebas múltiplex conlleva el estudio de los todos los factores que intervienen en la PCR, principalmente la interacción de los oligonucleótidos para cada uno de los sitios génicos estudiados²⁰. Las variables que se tienen que investigar son la selección de la temperatura adecuada de hibridación del iniciador y que esta sea específica,

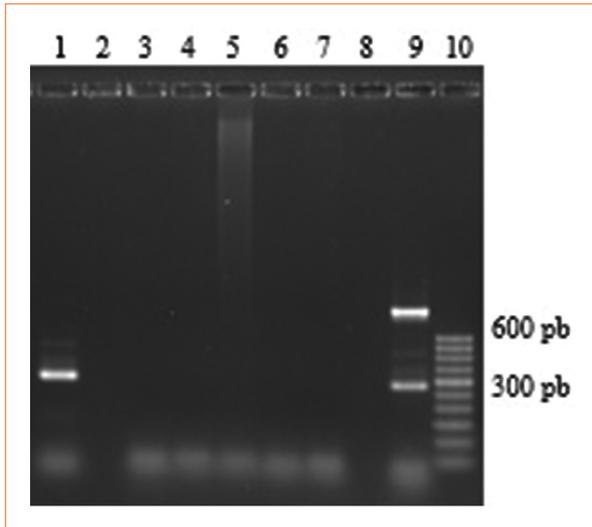


Figura 2. Desarrollo electroforético de la PCR tríplex para el gen *ompA* y *orf6* de *C. trachomatis* y el gen *rRNA16s* de *Mycoplasma/Ureaplasma*. Del pozo 1 al 7, muestras clínicas, de las cuales el pozo 1 presenta amplificación con productos de 303 y 460 pb correspondientes al *orf6* y gen *ompA* de *C. trachomatis*; en el 8, control negativo; en el 9, control positivo con amplicones de *C. trachomatis* (*orf6* y del gen *ompA*) y de *Mycoplasma/Ureaplasma* (gen *rRNA16s*), y en el 10, marcador de tamaño molecular. PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

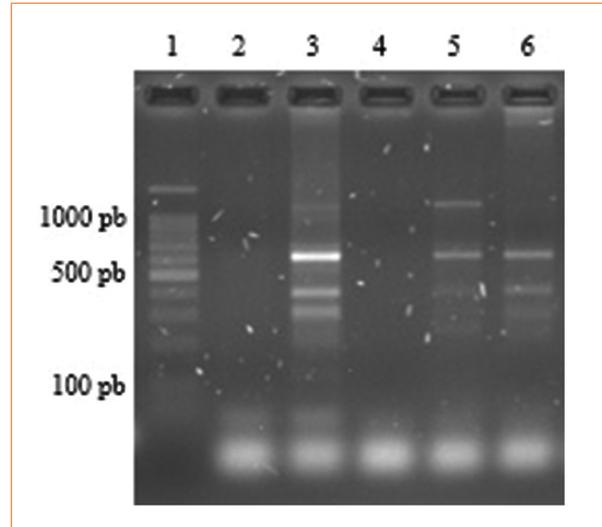


Figura 3. Desarrollo electroforético de la PCR cuádruplex para el gen *ompA* y *orf6* de *C. trachomatis*, el gen *rRNA16s* de *Mycoplasma/Ureaplasma* y el gen *rRNA16s* de *G. vaginalis*. El pozo 1, marcador de tamaño molecular; en el 2, control negativo; en el 3, control positivo donde se observan los productos de amplificación de los cuatro sitios génicos estudiados (*orf6* y *ompA* de *C. trachomatis*, *rRNA16s* de *Mycoplasma/Ureaplasma* y *rRNA16s* de *G. vaginalis*); en el 5, muestra clínica positiva a *C. trachomatis*, *Mycoplasma/Ureaplasma* y *G. vaginalis*, y en el 6, muestra clínica positiva a *C. trachomatis* y a *Mycoplasma/Ureaplasma*. PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

además de observar si no hay dimerización o formación de estructuras que impiden su correcta alineación e identificación con la cadena de ADN²¹. Así mismo, se tienen que establecer las concentraciones adecuadas de cada uno de los componentes de la reacción de PCR para que no haya elementos limitantes que impidan su correcto funcionamiento²².

Durante el desarrollo de este trabajo se obtuvieron resultados satisfactorios no solo en pruebas dúplex sino en la tríplex y en la cuádruplex. Lo anterior representa un logro que posibilita que nuestras pruebas se utilicen para el diagnóstico, ya que los resultados fueron verificados en paralelo con el sistema automatizado HybriSpot 12 (Vitro). Este sistema de diagnóstico utiliza la tecnología DNA-Flow que mediante una PCR múltiple y la posterior hibridación en membrana con sondas de ADN específicas permiten la identificación de hasta 11 microorganismos en su panel de ETS. Los resultados obtenidos en nuestras pruebas caseras fueron similares a los del HybriSpot 12 (Vitro) a excepción de *G. vaginalis*, que no se incluye en el panel de ETS de Master Diagnostica®.

Además, se corroboró que los productos obtenidos en cada una de las pruebas de PCR tanto simple como

múltiples pertenecen a los microorganismos estudiados. Lo anterior se obtuvo mediante el análisis *in silico* de las secuencias de los amplicones obtenidos; estos datos fueron sometidos a métodos bioinformáticos, permitiéndonos establecer la correcta identidad de los genes y el microorganismo al que pertenecen.

En concreto, se logró obtener una prueba de PCR tríplex que permite la identificación de los microorganismos denominados atípicos como *C. trachomatis* y micoplasmas. Esta prueba permitirá al clínico establecer un correcto diagnóstico y dar un tratamiento oportuno para impedir que se desarrollen las secuelas de una infección crónica por estas bacterias. Se conoce que la infección por *C. trachomatis* en mujeres puede derivar en endometriosis, oclusión tubo-ovárica, enfermedad pélvica inflamatoria e infertilidad²³. En recién nacidos de madres positivas se puede presentar neumonía atípica y en hombre epididimitis y proctitis²⁴. En el caso de los micoplasmas se ha observado el desarrollo de inflamación pélvica, adherencias epiteliales y probable infertilidad en mujeres, además que promueven la ruptura prematura

de membranas durante el embarazo¹¹. Así mismo, en el hombre los micoplasmas se han asociado a problemas de fertilidad por su capacidad de adherencia a los espermatozoides²⁵.

Finalmente, se consiguió implementar una prueba de PCR cuádruple que además de identificar a *C. trachomatis* y micoplasmas nos permite reconocer a *G. vaginalis*. Este logro es de suma importancia, ya que aunque *G. vaginalis* no se considera como patógeno primario en las ETS se encuentra asociado al desarrollo de la vaginosis bacteriana y a la implantación de bacterias como *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis*²⁶. En consecuencia, estos resultados pueden ofrecer una alternativa para el diagnóstico de aquellos microorganismos considerados atípicos o secundarios en México, pero que representan un gran impacto en la salud según estudios de países del primer mundo.

Conclusiones

Como se indicó, se logró obtener un panel de pruebas de PCR múltiple para el diagnóstico de *C. trachomatis*, *Mycoplasma* spp., *Ureaplasma* spp. y *G. vaginalis* que pueden ser utilizados como estudios sistemáticos con la ventaja de ser de bajo costo sin perder su especificidad y sensibilidad.

Financiamiento

La presente investigación no ha recibido ninguna beca específica de agencias de los sectores públicos, comercial o con ánimo de lucro.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Uso de inteligencia artificial para generar textos. Los autores declaran que no han utilizado ningún tipo de inteligencia artificial generativa en la redacción de este manuscrito ni para la creación de figuras, gráficos, tablas o sus correspondientes pies o leyendas.

Bibliografía

- Smith L, Angarone MP. Sexually transmitted infections. Urol Clin North Am. 2015;42(4):507-18.
- Wagenlehner FM, Brockmeyer NH, Discher T, Friese K, Wichelhaus TA. The presentation, diagnosis, and treatment of sexually transmitted infections. Dtsch Arztebl Int. 2016;113(1-02):11-22.
- Järvinen AK, Laakso S, Piiparinen P, Aittakorpi A, Lindfors M, Huopaniemi L, et al. Rapid identification of bacterial pathogens using a PCR- and microarray-based assay». BMC Microbiology. 2009;9:161.
- Barenfanger J, Drake C, Kacich G. Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. J Clin Microbiol. 1999;37(5):1415-8.
- Barnes MP. Influence of laboratory reports on prescribing of antimicrobials for urinary tract infection. J Clin Pathol. 1980;33:481-3.
- Check W. Managed care deeply affecting clinical microbiology. ASM News. 1998;64:495-500.
- Lazoka O, del Campo FJ, Muñoz FX. Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. Biosens Bioelectron. 2007;15;22(7):1205-17.
- Verroken A, Despas N, Rodríguez-Villalobos H, Laterre PF. The impact of a rapid molecular identification test on positive blood cultures from critically ill with bacteremia: A pre-post intervention study. PLoS One. 2019;14:e0223122.
- Pallen MJ, Butcher PD. New strategies in microbial diagnosis. J Hosp Infect. 1991;18(Suppl. A):147-58.
- Escobedo-Guerra MR, López-Hurtado M, Gutiérrez-Trujillo R, Guerra-Infante FM. Chlamydia trachomatis prevalence in women from the Hospital General de Zona No. 29. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2021;59(4):281-9.
- Rivera-Tapia JA, Rayo Santellan-Olea R, Sánchez-Hernández JA, Gil-Juárez C, Giono-Cerezo S. Detección múltiple de Mycoplasma genitalium, Ureaplasma urealyticum y Gardnerella vaginalis en mujeres asintomáticas. RelbCi. 2016;3(4):54-8.
- Kenyon C, Colebunders R, Crucitti T. The global epidemiology of bacterial vaginosis: A systematic review. Am J Obstet Gynecol. 2013;209(6):505-23.
- Li JH, Yin YP, Zheng HP, Zhong MY, Peng RR, Wang B, et al. A high-resolution melting analysis for genotyping urogenital Chlamydia trachomatis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010;68(4):366-74.
- van Kuppeveld FJ, van der Logt JT, Angulo AF, van Zoest MJ, Quint WG, Niesters HG, et al. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. Appl Environ Microbiol. 1992;58(8):2606-15.
- Pillay K, Nzimande S, Naicker M, Ramsuran V, Tinarwo P, Abbai N. Prevalence of genotypes and subtypes of Gardnerella vaginalis in South African pregnant women. Infect Dis Obstet Gynecol. 2020;3176407.
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. J Comput Biol. 2000;7:203-14.
- Morgulis A, Coulouris G, Raytselis Y, Madden TL, Agarwala R, Schäffer AA. Database indexing for production MegaBLAST searches. Bioinformatics. 2008;24:1757-64.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties, and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 1994;22:4673-80.
- Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucleic Acids Res. 1988;16:10881-90.
- Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. Biotechniques. 1997;21:504-11.
- Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. Nucl Acids Res. 1990;18:6409-12.
- Frayling IM, Monk E, Butler R. Molecular Diagnostic Technologies. En: Coleman WB, Tsongalis GJ. Molecular diagnostics: For the clinical laboratorian. 2da edición. Nueva Jersey: Humana Press; 2010. p. 65-160.
- Passos LG, Terraciano P, Wolf N, Oliveira FDS, Almeida I, Passos EP. The correlation between Chlamydia Trachomatis and female infertility: A systematic review. Rev Bras Ginecol Obstet. 2022;44(6):614-20.
- González-Fernández MD, Escarcega-Tame MA, López-Hurtado M, Flores-Salazar VR, Escobedo-Guerra MR, Giono-Cerezo S, et al. Identification of Chlamydia trachomatis genotypes in newborns with respiratory distress. An Pediatr (Eng Ed). 2023;98(6):436-45.
- Paira DA, Olivera C, Tissera AD, Molina RI, Olmedo JJ, Rivero VE, et al. Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis urogenital infections associate with semen inflammation and decreased sperm quality. J Leukoc Biol. 2023;113(1):18-26.
- Jain JP, Bristow CC, Pines HA, Harvey-Vera A, Rangel G, Staines H, et al. Factors in the HIV risk environment associated with bacterial vaginosis among HIV-negative female sex workers who inject drugs in the Mexico-United States border region. BMC Public Health. 2018;18(1):1032.