

## “Studio del ruolo patogenetico di *Ureaplasma urealyticum* e di *Mycoplasma genitalium* a livello di mucosa uretrale”

S. Licenziati, F. Martinelli, S. Fiorentini, E. Garrafa, A. Turano, A. Caruso.

Istituto di Microbiologia, Università degli Studi di Brescia

**Riassunto:** La presenza di *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma genitalium* è stata rivelata nel tratto uretrale di soggetti sani e di pazienti HIV-1 sieropositivi che non presentavano sintomi di uretriti. I risultati ottenuti mostrano che la prevalenza dei due microorganismi è superiore nei pazienti con AIDS che nei pazienti HIV-1 sieropositivi asintomatici e nei soggetti sani di controllo. L'alta incidenza di colonizzazione da parte di *Ureaplasma urealyticum* e di *Mycoplasma genitalium* in pazienti con AIDS, in assenza di uretrite, non depone per un ruolo patogenetico di tali microorganismi a livello di mucosa uretrale.

**Abstract:** The presence of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma genitalium* has been detected in the urethral tract of healthy donors and HIV-1 seropositive patients with no clinical or laboratory signs of urethritis. The results show that the prevalence of both microorganisms is higher in AIDS patients than in asymptomatic HIV-1-seropositive patients and in healthy subjects. The high rate of *U. urealyticum* and *M. genitalium* detected in AIDS patients, in the absence of urethritis, argues against a pathogenetic role of these microorganisms at the urethral mucosal level.

### Introduzione

Il ruolo del *Mycoplasma genitalium* e dell'*Ureaplasma urealyticum* nelle uretriti acute, in assenza di infezione gonococcica nell'uomo, non è stato ancora accertato (6). Il ruolo patogenetico del *M. genitalium* è stato ipotizzato in quanto, tale microorganismo, veniva isolato con notevole frequenza nel tratto urogenitale di pazienti affetti da uretrite acuta non gonococcica (3,14,17). Allo stesso modo, l'*U. urealyticum* è stato considerato un patogeno del tratto urogenitale perché il suo isolamento è più comune in pazienti con uretriti acute non gonococciche che in soggetti asintomatici (9). Comunque, la presenza del *M. genitalium* (6,7,13,18) e dell'*U. urealyticum* (1,12) nell'uretra di soggetti sani, senza sintomi di infezione del tratto urinario, di uretriti, o di prostatiti nel corso dell'indagine, contraddicono questa ipotesi.

I pazienti infetti da HIV-1 sono caratterizzati dalla progressiva diminuzione del numero di cellule T CD4<sup>+</sup>(4). Negli stadi più avanzati della malattia queste alterazioni si riflettono, clinicamente, in un' aumentata frequenza di infezioni opportunistiche (5,10,11).

L'obiettivo del nostro lavoro è stato studiare il ruolo patogenetico di *M. genitalium* ed *U. urealyticum* a livello uretrale osservando la presenza di entrambi i microorganismi nei tamponi uretrali prelevati da pazienti maschi asintomatici infetti da HIV-1 e da pazienti maschi con AIDS conclamato; nessun gruppo di pazienti aveva sintomi di uretriti acute. I dati mostrano che *M. genitalium* ed *U. urealyticum* possono colonizzare in misura maggiore volontari sani.

### Pazienti

Venivano arruolati per lo studio 187 pazienti maschi eterosessuali infetti da HIV-1 (tutti facevano abuso di droga per via endovenosa). L'età dei pazienti positivi per HIV-1 era tra i 18 e i 40 anni (età media 28 anni). Lo stadio clinico dei pazienti infetti da HIV-1 è stato definito seguendo il criterio di classificazione del Centers for Disease Control (C.D.C.) di Atlanta, U.S.A. (2): 115 pazienti infetti da HIV-1 erano asintomatici (stadio A1) (presentavano circa 2105 ± 565 linfociti, CD3 75% ± 3%, CD4 30% ± 8%, CD8 45% ± 15%, CD4/CD8 0.7% ± 0.4%), mentre 72 pazienti erano in stadio di AIDS conclamato.

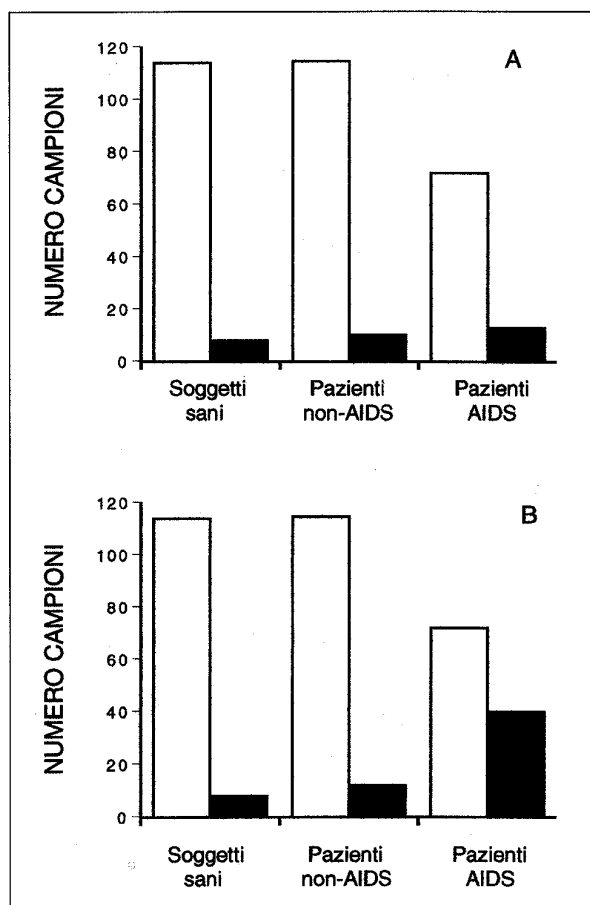


Figura 1. Frequenza di colonizzazione della mucosa uretrale di soggetti sani e pazienti infetti da HIV-1 da parte di *U. urealyticum* (A) e di *M. genitalium* (B) (□ totale dei campioni, ■ campioni positivi).

mato (C3) (presentavano circa  $1.000 \pm 560$  linfociti, CD3 69%  $\pm$  12%, CD4 18%  $\pm$  4%, CD8 62%  $\pm$  8%, CD4/CD8 0.1%  $\pm$  0.03%). Il gruppo di controllo era composto da 114 volontari maschi sani, in età compresa tra 20 e 41 anni (età media 27 anni) (presentavano circa  $3.000 \pm 363$  linfociti, CD3 79%  $\pm$  6%, CD4 48%  $\pm$  7%, CD8 30%  $\pm$  5%, CD4/CD8 1.65  $\pm$  0.6%). Sia i pazienti positivi per HIV-1 che il gruppo di controllo erano composti da soggetti italiani attivi sessualmente. I campioni prelevati risultavano completamente randomizzati in quanto ottenuti in un arco di tempo compreso tra il 1995 ed il 1998. Sia i pazienti che i soggetti sani erano valutati mediante un protocollo standard che includeva l'acquisizione di informazioni sull'attività sessuale, un controllo dei genitali eseguito da medici per confermare l'assenza di processi infiammatori e di lesioni patologiche, e due tamponi uretrali per l'individuazione del *M. genitalium* e dell'*U. urealyticum*. Tutti

i campioni venivano esaminati al microscopio per escludere la presenza di altri microorganismi patogeni, spore, o leucociti.

### Materiali e metodi

Le condizioni di crescita per *U. urealyticum* erano le seguenti: i tamponi uretrali venivano stemperati in 2 ml di terreno di trasporto ed analizzati per *U. urealyticum* mediante due metodi tra loro complementari: una coltura convenzionale (Mycotrim GU; Irvine Scientific, Santa Ana, Calif.) e una coltura con valutazione della crescita del microorganismo mediante saggio biochimico (MYCOFAST; DID, Milano) (12). La coltura convenzionale prevede una fiasca (Mycotrim GU) contenente agar ed un brodo per la crescita dell'*U. urealyticum*; le colture positive aumentando il valore di pH, causano nel terreno un cambiamento di colore, e le colonie vengono identificate mediante osservazione al microscopio ottico.

Il saggio biochimico (MYCOFAST) segnala la crescita mediante il cambiamento di colore da giallo ad arancione o rosso, ed *U. urealyticum* è identificato per la sua sensibilità/resistenza ad una serie di antibiotici. La titolazione della carica batterica ottenuta mediante diluizione del campione viene definita in termini di colonie formanti unita' (CFU)/ml.

Le condizioni di crescita o di rivelazione del DNA di *M. genitalium* erano le seguenti: i tamponi uretrali venivano stemperati in 2 ml di terreno di trasporto, dei quali 1 ml veniva aggiunto a 5 ml di terreno SP-4, indicato per l'isolamento del microorganismo (17), ed 1 ml serviva per l'estrazione del DNA, dopo essere stato sottoposto a centrifugazione per ottenere un pellet, che veniva processato come già descritto (13). In breve, il pellet era risospeso in 200 ml. di tampone TE, lisato, e incubato con 50 ml. di proteina K (Boehringer, Mannheim, Germany) per 4 h a 55°C. Il DNA veniva estratto due volte con un volume uguale di fenolo saturato con il tampone TE ed una volta con alcool chloroform-isoamyl (96:4, vol/vol). Dopo l'estrazione e la precipitazione con 3 M di acetato di sodio ed etanolo al 95%, il pellet veniva risospeso in 40 ml. di tampone TE. Allo stesso modo veniva processato un pellet di *M. genitalium* ATCC 33530 cresciuto in brodo SP-4, raccolto mediante centrifugazione per 15 min. a 8,000 X g. I primers MgPa 1 (5'-AGTTGATGAAACCT-TAACCCCTTGG-3') e MgPa 3 (5'-CCGTTGAGGGGTTTCCATTTTGC-3') erano quindi impiegati per l'amplificazione del genoma del *M. genitalium*; essi amplificano un segmento di 281-bp del gene della proteina di adesione di 140-kDa (8). L'amplificazione (Amplitaq; Perkin-Elmer

Cetus, Norwalk, Conn.) era eseguita per 35 cicli (1 min. a 94°C, 1 min. a 65°C, e 1 min. a 72°C), con un termociclatore automatico (Perkin-Elmer Cetus). Il metodo di southern blotting veniva eseguito come descritto in precedenza (13). Il DNA veniva trasferito su membrane Zeta (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif.) e la preibridizzazione si otteneva incubando la membrana per 1 h a 42°C in tampone Rapid-Hib (Amersham, Little Chalfont, United Kingdom) (7). L'ibridizzazione veniva eseguita in tampone Rapid-Hib contenente 30 pmol di oligonucleotide biotinilato MgPa 2 (5'-GACCATCAAGG-TATTTCTCAACAGC-3') per 2h a 42°C. Dopo ibridizzazione, la membrana veniva lavata per due volte in 5 X SSC (0,3 M NaCl più 0,03 M trisodio citrato, pH 7,0) contenente SDS allo 0.1% per 15 min. a temperatura ambiente, e per due volte in 0,1 X SSC contenente lo 0,1% di SDS per 30 min. a 42°C. I reagenti per la rivelazione non radioattiva dell'avvenuta ibridizzazione venivano acquistati dalla Millipore, Bedford, Mass. Gli ibridi di DNA erano visualizzati mediante esposizione della membrana su lastra fotografica.

La PCR veniva considerata positiva se rivelava una banda corrispondente al frammento di 281 paia di basi amplificato dal DNA di *M. genitalium* ATCC 33530 e specificamente ibridizzato dalla sonda oligonucleotidica per *M. genitalium* denominata MgPa 2.

## Risultati

L'*U. urealyticum* si riscontrava nel tratto uretrale di 23 (12.3 %) pazienti infetti da HIV-1 e di 8 (7.0 %) soggetti sani; nei pazienti non-AIDS si evidenziavano 10 (8.5 %) campioni positivi. Messi a confronto soggetti sani e pazienti non-AIDS, un drammatico aumento nella frequenza di colonizzazione di *U. urealyticum* era osservato in pazienti con AIDS, con 13 (18%) campioni positivi (Figura 1A-1B). L'aumento dell'*U. urealyticum* tra soggetti sani e pazienti AIDS, e tra pazienti non-AIDS e pazienti AIDS e' risultato statisticamente significativo, come dimostrato con il test t di Student ( $p < 0.05$ ). La differenza tra soggetti sani e pazienti non-AIDS si e' rivelata statisticamente non significativa. Non si e' evidenziata una differenza qualitativa nei risultati ottenuti con i due metodi di coltura per l'*U. urealyticum*. Tutte le colture positive, a prescindere dal gruppo dei pazienti, avevano crescite del numero superiori a  $10^4$  CFU/ml dopo 24 h di incubazione.

Il *M. genitalium* veniva individuato nel tratto uretrale di 52 (27.8 %) pazienti infetti da HIV-1. La frequenza del DNA del *M. genitalium* nei pazienti

non-AIDS e' stata uguale a quella dei soggetti sani; sono stati trovati positivi per il *M. genitalium* 8 (7.0 %) tamponi uretrali ottenuti da soggetti sani e 12 (10.4 %) tamponi uretrali ottenuti da pazienti non-AIDS. La presenza di colonizzazione da *M. genitalium* aumentava drammaticamente, ed in maniera statisticamente significativa nei campioni di pazienti AIDS. Infatti, 40 (56.0 %) campioni risultavano positivi in PCR. *M. genitalium* non veniva isolato in SP-4 da nessun campione analizzato.

## Discussione

Il *M. genitalium* e l'*U. urealyticum* si trovano normalmente nel tratto uretrale di soggetti sani (1, 2, 6, 7, 12, 13, 18). Nel nostro studio il 7.0 % dei campioni di soggetti sani e' risultato positivo per entrambi i microorganismi. Nei pazienti non-AIDS la frequenza di colonizzazione del *M. genitalium* e dell'*U. urealyticum* e' praticamente simile a quella osservata nei soggetti sani. Al contrario la frequenza di colonizzazione del *M. genitalium* e dell'*U. urealyticum* e' significativamente aumentata nei pazienti AIDS. La presenza di questi due microorganismi puo' essere spiegata da due fenomeni l'uno non escludente l'altro. Da un lato tali dati potrebbero essere il risultato di una difettosa immunita' umorale e cellulosa-mediata dei pazienti AIDS. Dall'altro non si puo' escludere che la colonizzazione uretrale di ceppi di *M. genitalium* ed *U. urealyticum* antibiotico-resistenti in pazienti AIDS possa essere collegata ad alterazioni dell'ambiente urogenitale a seguito di terapie antibiotiche, cosi' intensivamente praticate in questi soggetti. Infatti le differenze nella frequenza del *M. genitalium* e dell'*U. urealyticum* tra i pazienti AIDS e i pazienti non-AIDS possono essere attribuite alle differenze nell'impiego di antibiotici nei due gruppi di pazienti; nei pazienti non-AIDS viene solitamente utilizzato un antibiotico ad ampio spettro, impiegato per una profilassi a lungo termine; nei 4 pazienti AIDS viene invece solitamente praticata una profilassi a largo spettro. Questa ipotesi e' anche sostenuta dal nostro recente studio della resistenza dell'*U. urealyticum* a differenti antibiotici, inclusi chinoloni e tetracicline, nei pazienti AIDS (12).

Concludendo, questo studio dimostra che il *M. genitalium* e l'*U. urealyticum* colonizzano l'uretra di pazienti con AIDS e in minor misura l'uretra di soggetti asintomatici infetti da HIV cosi' come soggetti sani senza sintomi di uretrite. La nostra osservazione non depone per un ruolo patogenetico di questi microorganismi a livello della mucosa uretrale.

## Bibliografia

1. Carey JC, Blackwelder WC, Nugent RP. Antepartum cultures for *Ureaplasma realyticum* are not useful in predicting pregnancy outcome. Am. J. Obstet. Gynecol. 164, 728-733, 1991.
2. Centers for Disease Control. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 41, 1-19, 1993.
3. Deguchi T, Komeda H, Yasuda M, Tada K, Iwata H, Asano M, Ezaki T, Kawada Y. *Mycoplasma genitalium* in non-gonococcal urethritis. Int. J. STD AIDS 6, 144-145, 1995.
4. Fauci AS. Immunopathogenetic mechanisms in human immunodeficiency virus (HIV) infection. Ann. Intern. Med. 114, 678-693, 1991.
5. Hawkins RE, Rickman LS, Vermund SH, Carl M. Association of mycoplasma and human immunodeficiency virus infection: detection of amplified *Mycoplasma fermentans* DNA in blood. J. Infect. Dis. 165, 581-585, 1992.
6. Horner PJ, Gilroy CB, Thomas BJ, Naidoo RO, Taylor-Robinson D. Association of *Mycoplasma genitalium* with acute non-gonococcal urethritis. Lancet 342, 582-585, 1993.
7. Jensen JS, Orsum R, Dohn B, Uldum SA, Worm AM, Lind K. *Mycoplasma genitalium*: a cause of male urethritis? Genitourin. Med. 69, 265-269, 1993.
8. Jensen JS, Uldum SA, Sondergard-Andersen J, Vuust J, Lind K. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples. J. Clin. Microbiol. 29, 46-50, 1991.
9. Koch A, Bilina A, Teodorowicz L, Stary A. *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in patients with sexually transmitted diseases. Wien. Klin. Wochenschr. 109, 584-589, 1997.
10. Lane HC. Qualitative analysis of immune function in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. N. Engl. J. Med. 313, 79-84, 1985.
11. Levy JA. Human immunodeficiency viruses and the pathogenesis of AIDS. JAMA 261, 2997-3006, 1989.
12. Martinelli F, Caruso A, Ausenda S, Corulli M, Licenziati S, Garrafa E, Turano A. Isolation and chemotherapeutic resistance of *Ureaplasma urealyticum* in HIV-1-infected patients. Microbiologica 21, 233-240, 1998.
13. Savio ML, Caruso A, Allegri R, Fallacara F, Pollara CP, Foresti I, Comberti E, Gargiulo F, Dima F, Cadeo GP, Turano A. Detection of *Mycoplasma genitalium* from urethral swabs of human immunodeficiency virus-infected patients. Microbiologica 19, 203-210, 1996.
14. Taylor-Robinson D, Tully JG, Furr PM, Cole RM, Rose DL, Hanna NF. Urogenital mycoplasma infections in man: a review with observations on recently discovered mycoplasma. Isr. J. Med. Sci. 17, 524-530, 1981.
15. Taylor-Robinson D, Gilroy GB, Hay PE. Occurrence of *Mycoplasma genitalium* in different populations and its clinical significance. Clin. Infect. Dis. 17, 66-68, 1993.
16. Tully JG, Taylor-Robinson D, Rose DL, Cole RM, Bove JM. *Mycoplasma genitalium*, a new species from the human urogenital tract. Int. J. Syst. Bacteriol. 33, 387-396, 1983.
17. Uno M, Deguchi T, Komeda H, Yasuda M, Tamaki M, Maeda S, Saito A, Kawada Y. Prevalence of *Mycoplasma genitalium* in men with gonococcal urethritis. Int. J. STD. AIDS 7, 443-444, 1996.
18. Uno M, Deguchi T, Saito A, Yasuda M, Komeda H, Kawada Y. Prevalence of *Mycoplasma genitalium* in asymptomatic men in Japan. Int. J. STD AIDS 8, 259-260, 1997.