



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

---

---



Facultad de Estudios Superiores  
Cuautitlán

**“Ureaplasma urealyticum Como Riesgo  
Perinatal de Infección”**

Química Farmacéutica Bióloga

PRESENTA

Irma Elena Sosa González

Cuautitlán Izcalli, Estado de México

1988

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# I N D I C E

	PAG.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
ANTECEDENTES	5
CARACTERISTICAS MICROBIOLÓGICAS	7
DESCRIPCION COLONIAL	11
PROPIEDADES METABOLICAS	15
CARACTERISTICAS GENÉTICAS	16
MECANISMO DE PATOGENICIDAD	17
DIAGNOSTICO	23
ASPECTOS INMUNOLÓGICOS	30
ASPECTOS CLINICOS	35
TRATAMIENTO	39
OBJETIVOS	41
MATERIAL Y METODOS	42
MATERIAL UTILIZADO	42
REACTIVOS UTILIZADOS	43
MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS	43
METODOLOGIA	44
RESULTADOS	49
DISCUSION	56
CONCLUSIONES	60
APENDICE	61
BIBLIOGRAFIA	68

## R E S U M E N

Este trabajo se realizó durante el periodo comprendido de agosto de 1986 a septiembre de 1987, en el Departamento de Infectología e Inmunología Perinatal del Instituto Nacional de Perinatología (INPer).

Se estudiaron 380 mujeres embarazadas cuya edad promedio fue de  $28.6 \pm 5.89$  años y edad gestacional promedio de  $29.04 \pm 6.28$  semanas. También se sometieron al estudio 374 mujeres no embarazadas sexualmente activas, cuya edad promedio fue de  $25.48 \pm 4.75$  años. Las pacientes acudieron a la consulta por presentar como sintomatología fundamental la presencia de leucorrea.

A cada una de las pacientes se les tomó muestras de cérvix y de fondo de saço, las cuales se les cultivó para Ureaplasma con la metodología adecuada y las condiciones óptimas necesarias para el crecimiento de estos microorganismos. Se emplearon dos medios de cultivo, los cuales son: el caldo Urea para su primoaislamiento y agar E para su posterior subcultivo.

Los resultados obtenidos señalaron que la frecuencia total de aislamiento de U. urealyticum fue del 21.5% en el grupo de embarazadas y siendo solo el 16.3% en el de no embarazadas. Siendo recuperado con más frecuencia de cérvix que en vagina, ésto en ambos grupos.

Finalmente, se realizó una comparación de los resultados con los obtenidos por otros autores (2, 3, 31, 32, 44, 45, 77) por lo que se llegó a la conclusión de que estos microorganismos se encuentran colonizando el tracto genital femenino formando parte de la flora normal y que el embarazo favorece que éste actúe como otro microorganismo oportunista, provocando infecciones con manifestaciones clínicas.

## I N T R O D U C C I O N

Los Mycoplasmas constituyen un grupo relativamente nuevo y heterogéneo de microorganismos dentro de la patología humana. Se han descubierto 50 variantes de Mycoplasmas, aunque tan solo un corto número se han podido aislar en el hombre.

Actualmente los micoplasmas son de gran importancia, debido a que se ha reconocido su papel patógeno en entidades clínicas como la neumonía atípica primaria, y en la uretritis no gonocócica (UNG) (77).

El Mycoplasma pneumoniae y Ureaplasma urealyticum son patógenos para el ser humano, en tanto otras, actúan como saprofitos, (tabla 1). M. pneumoniae es responsables de patología a nivel de las vías respiratorias, mientras que los micoplasmas genitales, sólo dos especies son de importancia clínica, Mycoplasma hominis y Ureaplasma urealyticum, éstos se han recuperado tanto de hombres como mujeres en condiciones de salud aparente, así como de procesos patológicos bien definidos (76-78).

Los micoplasmas se han visto involucrados en algunas infecciones del tracto urogenital, teniendo relevancia en algunas condiciones especiales como el embarazo, de tal manera que en la actualidad, es posible establecer su participación en absceso de la glándula de Bartholin (36), vaginitis inespecífica (34), enfermedad pélvica inflamatoria (18), fiebre post-aborto, fiebre post-parto (44), infección urinaria (80), infertilidad (45), muerte perinatal (16), aborto espontáneo

(34), corioamnionitis (25), así como diversas repercusiones en el neonato (34).

La metodología moderna para cultivar, identificar y caracterizar a los micoplasmas, ha permitido establecer con cierta precisión su participación en algunas patologías perinatales, sin embargo, aún queda por dilucidar el papel que tienen en algunos procesos perinatales.

Es evidente que una de las dificultades para el diagnóstico temprano de las infecciones debidas a los Mycoplasmas es la gran cantidad de especies existentes, más aún si se toma en cuenta que determinados casos pueden formar parte de la flora normal. De igual manera, la ausencia de síntomas más o menos constantes y la falta de hallazgos físicos característicos dificultan todavía más el diagnóstico diferencial que con frecuencia no es fácil establecer, particularmente entre una infección por micoplasmas y una provocada por hongos o virus (1).

En nuestro país no hay estudios en los que se haya determinado con qué frecuencia se encuentran diversos microorganismos en población aparentemente sana, ni la sintomatología y signos clínicos que aparecen como consecuencia de la infección no se tienen estudios prospectivos en mujeres colonizadas en las mucosas urogenitales, las cuales se embarazan sin poder determinar el riesgo perinatal. A nivel mundial existen dificultades para documentar la fisiopatología de la infección por U. urealyticum así como su recuperación perinatal.

En México no se tiene información que puede dar una noción de la magnitud que este problema representa, sin embargo, no es aventurado pensar que es posible tener porcentajes muy semejantes a los observados en otros países (1-77).

## A N T E C E D E N T E S

En Europa, durante el siglo XVIII se presentó en el ganado vacuno una enfermedad pulmonar altamente contagiosa a la cual se le denominó pleuroneumonía. Fue hasta el año de 1898 cuando Nocard y Roux lograron aislar el agente causal de esta nosología desconociendo que se trataba precisamente de Mycoplasma mycoides. Inicialmente y de forma abreviada se les denominó PPLO (pleuro-pneumoniae like organisms), a todos los microorganismos semejantes a los agentes de la pleuropulmonía bovina. Siendo hasta la década de los sesenta cuando junto con otras cepas se les asignó el nombre genérico de Mycoplasma (11).

Después de el aislamiento de M. mycoides, en las cabras se identificó otro micoplasma que producía una patología similar, el M. capri y en los cerdos el agente es el M. pulmonis. De igual manera, el M. pulmonis produce patología de vías respiratorias en ratones y ratas (24, 75).

Klienerberger (1935) trabajando con cultivos de Streptobacillus moniliformis descubrió las formas L, muy parecidos a los microorganismos antes descritos, les llamó así porque se aislaron en el Instituto Lister de Londres. Dienes y Edsall, en 1937 identificaron un micoplasma como agente etiológico de un absceso de la glándula de Bartholin, siendo el primer reporte en el que se reconoce la enfermedad en el humano. Eaton y colaboradores (1944), aisla por primera vez a M. pneumoniae, a partir de un embrión de pollo, la muestra

provenía de un paciente con neumonía atípica primaria (46).

En 1954 a partir de un enfermo con uretritis no gonocócica (UNG), Shepard identificó al Mycoplasma especie-T, conocido actualmente como Ureaplasma urealyticum (1974) (24).

Edward y Freundt (1956) proponen una nueva nomenclatura, en donde la designación PPLO fue descartada en favor de micoplasmas. A estas bacterias se les consideró virus durante muchos años, hasta que de Marmion, Goodburn y Chanock demuestran que el agente Eaton era en realidad el M. pneumoniae, considerado un virus hasta entonces (1960). Es a partir de esta época, cuando se han logrado grandes avances en el estudio de los micoplasmas que afectan a los animales, vegetales y humanos (1).

## CARACTERISTICAS MICROBIOLOGICAS

Según la clasificación de Bergey, pertenecen a la clase Mollicutes, a la orden Mycoplasmatales, familia Mycoplasmataceae, con dos géneros: Mycoplasma y Ureaplasma (cuadro 1).

Los Mycoplasmas son los microorganismos de vida extracelular más pequeños (150-250 nm), lo que motivó a que inicialmente fueran considerados partículas virales (38, 43).

Los micoplasmas se caracterizan porque carecen de pared celular, evento que los distingue de las demás bacterias, y se dice que son incapaces de sintetizar peptidoglicana o precursores; pueden cultivarse en medios libres de células; requieren de colesterol para su crecimiento (excepto Acholeplasma); su crecimiento y/o el metabolismo, es inhibido por anticuerpos específicos; son susceptibles a los antimicrobianos que afectan la síntesis de proteínas y resistentes a los agentes que actúan a nivel de la formación de pared celular; se limitan sólo por una membrana plasmática, son filtrables y su tamaño es de 75-100 Å de espesor, siendo composición general de: proteínas, glucolípidos y colesterol, su integridad se mantiene gracias a la presencia de los iones de magnesio; la ausencia de pared celular los hace sensibles a la lisis por choque osmótico, detergentes, alcoholes y anticuerpos más complemento (83).

Debido a la ausencia de esta pared, que le da forma y consistencia a las bacterias, los Mycoplasmas se tiñen deficientemente y su plomorfismo es mayor que el de las bacterias (de ahí deriva el nombre de Mycoplasma) (1).

C U A D R O 1  
CLASIFICACION DE LA CLASE MOLLICUTES

DIVISION: Tenaricutes (procariotes sin pared celular)

CLASE: Mollicutes

ORDEN I: Mycoplasmatales

- Tamaño del genoma  $5 \times 10^8$  -  $1 \times 10^9$  daltons
- Localización del NADH oxidasa en el citoplasma
- Requerimientos de esteroides para su crecimiento

FAMILIA I: Mycoplasmataceae

- Medida del genoma  $5 \times 10^8$  daltons

GENERO I: Mycoplasma (alrededor de 76 especies)

- No hidroliza la urea
- Algunos fermentan la glucosa y/o hidrolizan arginina
- G + C de DNA 22 a 41% mol.

GENERO II: Ureaplasma (2 especies)

- Hidroliza la urea
- G + C de DNA 27 a 30% mol.
- No fermentan los carbohidratos

FAMILIA II: Spiroplasmataceae

- Tamaño del genoma  $1 \times 10^9$  daltons
- Organismos helicoidales durante pocas fases de crecimiento

GENERO I: Spiroplasma (5 especies)

- Alrededor de 23 especies no clasificadas
- Fermentan la glucosa y la mayoría hidrolizan la arginina
- G + C de DNA 25 a 31% mol.

ORDEN II: Acholeplasmatales

- No requieren de esteroides para su crecimiento
- Tamaño del genoma  $1 \times 10^8$  daltons
- Localización de NADH oxidasa en membrana celular

FAMILIA I: Acholeplasmataceae

GENERO I: Acholeplasma (alrededor de 10 especies)

- G + C de DNA 27 a 36% mol.
- Mollicute de taxonomía incierta

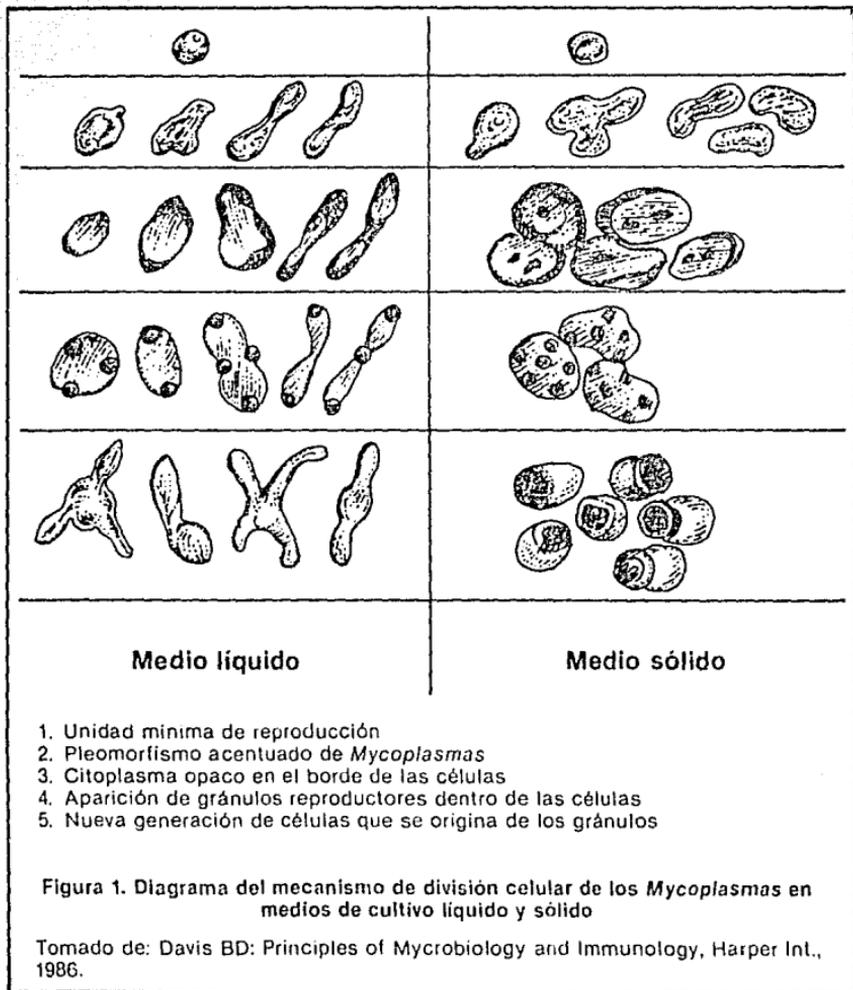
GENERO: Anaeroplasma

- Procariote sin pared celular
- Anaerobio obligado

Por su estructura los Mycoplasmatales pueden confundirse con formas L, protoplastos y esferoplastos, ya que también carecen de pared celular, la remoción de la misma en estas estructuras, se puede llevar a cabo por medio de la hidrólisis de la célula bacteriana con lisozima o por bloqueo de la biosíntesis de peptidoglicana con antibióticos, como la penicilina. Algunas especies microbianas producen formas L espontáneamente, lo cual les proporciona cierta resistencia al tratamiento con antibióticos. Estas variantes son difíciles de cultivar ya que habitualmente requieren de un medio de cultivo que les provea de estabilidad osmótica adecuada. Las formas L producen colonias muy semejantes a las que forman algunos micoplasmas, dentro de esta estructura hay algunas que revierten a su forma original, y otras son estables (13, 32).

En cuanto a los constituyentes intracelulares que los integran los Mycoplasmatales, están constituidos por ribosomas y filamentos nucleares (DNA y RNA) (57).

Se reproducen mediante la formación de un tabique bien definido, con la integración de unidades reproductoras de aproximadamente 0.3 nm debido a la ausencia de una pared celular rígida, la forma de replicación de los micoplasmas es diferente a la del resto de las bacterias. El mecanismo de división se ha precisado, aunque las observaciones microscópicas sugieren un tipo de fragmentación similar a la figura 1. Aunque en realidad es difícil establecer sus dimensiones debido a su plasticidad, algunos son filtrables, atraviesan filtros 0.450 nm de diámetro (43).



La integración de los septos aparentemente es regulado por mesosomas, carentes en los Mycoplasmatales, lo que les da un particular ciclo reproductivo (13, 43).

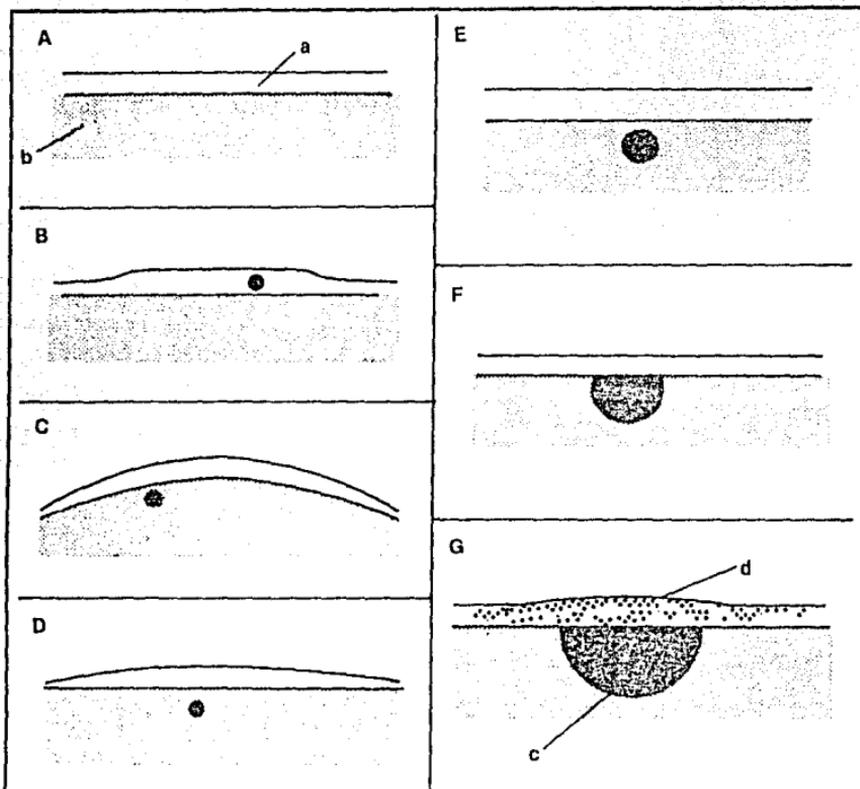
## DESCRIPCION COLONIAL

Al crecer en medios de cultivo, sus colonias presentan en general forma típica de "huevo frito" compuestas por dos zonas: una central granular densa y otra periférica traslúcida.

Su morfología microscópica es filamentososa o cocoide y su citoplasma contiene DNA y RNA así como ribosomas. Se multiplican en medios sintéticos carentes de células, pero necesitan nutrientes complejos que incluyen esteroides y levaduras. En algunas especies el crecimiento es bastante rápido pudiéndose observar el desarrollo de colonias en 48 horas, aunque esto generalmente toma de dos a cuatro días, otras especies crecen en forma lenta, necesitando hasta de siete a catorce días (13, 43).

Después de varios días de incubación se observan colonias de tamaño variable: M. pneumoniae, M. hominis y M. fermentans con colonias de 200 a 300 nm de diámetro. U. urealyticum produce colonias muy pequeñas, aproximadamente de 20 a 30 nm de diámetro.

Razin y Oliver (1961) describen el desarrollo de las colonias sobre el agar (fig. 2). La morfología característica de cada especie se describe en la tabla 2 (13).



- A. La superficie del agar sin ser inoculado. (a: superficie libre de partículas de agua; b: fibras que forman el agar)
- B. Se deposita una gota del inóculo sobre el agar
- C. Después de 15 minutos de la inoculación: la gota se absorbe en el agar y se forma un ligero aumento
- D. Conforme avanzan las primeras horas la colonia se internaliza en el agar sin mostrar cambios.
- E. Después de 18 hrs de inoculación se va formando la colonia dentro del agar mostrando aumento progresivo de tamaño
- F. Luego de 24 hrs la colonia formada se acerca a la superficie
- G. Aproximadamente después de 24-48 hrs. Crece en la superficie libre de agua en la zona periférica c: zona central; d: zona periférica. (Razin y Oliver, 1961).

Figura 2. Desarrollo de las colonias de micoplasmas sobre el agar

Tomado de Razin (1961)

T A B L A 1

MYCOPLASMAS	SITIO DE COLONIZACION	
	TRACTO	TRACTO
	RESPIRATORIO	GENITOURINARIO
<u>M. pneumoniae</u>	+	-
<u>M. salivarium</u>	+	-
<u>M. orale</u>	+	-
<u>M. buccale</u>	+	-
<u>M. faucim</u>	+	-
<u>M. lipophilum</u>	+	-
<u>A. laidlawii</u>	+	-
<u>M. hominis</u>	-	+
<u>U. urealyticum</u>	-	+
<u>M. fermentans</u>	-	+
<u>M. primatim</u>	-	+

T A B L A 2

E S P E C I E S	MORFOLOGIA COLONIAL
<u>Mycoplasma hominis</u> (tipo 1 y 2)	Apariencia de "huevo frito" con periferia espumosa.
<u>Mycoplasma salivarium</u>	Apariencia de "huevo frito" con periferia pequeña.
<u>Mycoplasma orale</u>	De "huevo frito" con periferia pequeña.
<u>Mycoplasma fermentans</u>	Granular, a menudo sin periferia.
<u>Mycoplasma pneumoniae</u>	Granular en el centro, con imagen en "mora" o "fresa", sin periferia.
<u>Ureaplasma urealyticum</u>	Apariencia de "corazón de coliflor" ligeramente alargada, la morfología característica de "huevo frito" sólo se observa en agar con buffer.

Las colonias de micoplasmas pueden ser confundidas con una serie de artefactos, incluyendo "pseudocolonias" compuestas por cristales de magnesio y calcio, gotas de agua, burbujas del agar y células animales (43).

## PROPIEDADES METABOLICAS

a) Requerimientos de esteroides.- Requieren de colesterol en medios de cultivo para su aislamiento, es una característica principal del género Mycoplasma y al parecer única entre los procariotes.

Mycoplasma y algunos Acholeplasmas dependen del colesterol para su crecimiento o algún otro esteroide para la síntesis de la membrana celular. Acholeplasmas y Thermoplasmas no requieren de esteroides.

Los Acholeplasmataceae (excepto A. axanthum y A. modum), pueden sintetizar carotenoides, tienen la capacidad de formar además, a partir de acetato, lípidos.

Siendo las células más pequeñas de las que se sabe pueden vivir libremente, se ha calculado teóricamente el fenómeno para contener los elementos macromoleculares para la reproducción extracelular. Se piensa que una función importante de las proteínas del suero, como factor de crecimiento, está en relación con el metabolismo de lípidos, puesto que uno de los componentes del suero de caballo es una  $\alpha$ -1 lipoproteína, que contiene colesterol esterificado y fosfolípidos. Cuando se extraen los lípidos del suero, ni los lípidos, ni la fracción carente de ellos pueden por sí mantener el crecimien

to, siendo necesarias ambas fracciones. Otro factor especial para su crecimiento lo aporta el extracto de levadura, es un rico sustrato de vitamina B y es rico en magnesio (1,270  $\mu\text{g/g}$ ), algunas especies lo requieren para su crecimiento (M. pneumoniae, M. orale tipo 1 y 3 y U. urealyticum) (13, 43).

Algunas especies humanas como M. fermentans tienen la capacidad de fermentar la glucosa (también M. laidlawii), mientras que la mayor parte no la fermentan, M. hominis y U. urealyticum, son algunos de ellos, se ha reportado que son inhibidas en su crecimiento con una concentración de glucosa del 1% (p/vol) (95). Cooks y cols., han reportado en estudios recientes que existe poca actividad de las enzimas de la glicolisis en U. urealyticum, además de la ausencia de la hexocinasa (57).

En cambio M. hominis y U. urealyticum tiene la capacidad de degradar la arginina y la urea, respectivamente, con la producción consecuente de  $\text{NH}_3$  y  $\text{CO}_2$  con el aumento de pH, por la producción del amoníaco (38, 66, 67).

Todos ellos poseen un contenido relativamente bajo de ácidos nucleicos en comparación a otras bacterias, casi todos requieren de precursores de estos ácidos nucleicos en el medio (uracilo, guanina y citosina) (43).

## CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS

Por análisis filogenéticos Wore y cols., concluyeron que los Mycoplasmatales son descendientes de un Clostridium ancestral. La evidencia de esta hipótesis se pone de manifiesto con los datos que se han obtenido al analizar las secuencias

de RNA de los primeros y compararlos con estas bacterias grampositivas. Se ha visto que dentro de su homología es que poseen un genoma de 500 microdaltons, cuentan con un contenido extremadamente bajo de pares de guanina-citosina (G-C), aproximadamente en un porcentaje de 23-46 mol %. Esto impone considerables restricciones en la capacidad de codificación explicando el bajo número de proteínas celulares (57) (cuadro 2).

## MECANISMOS DE PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA

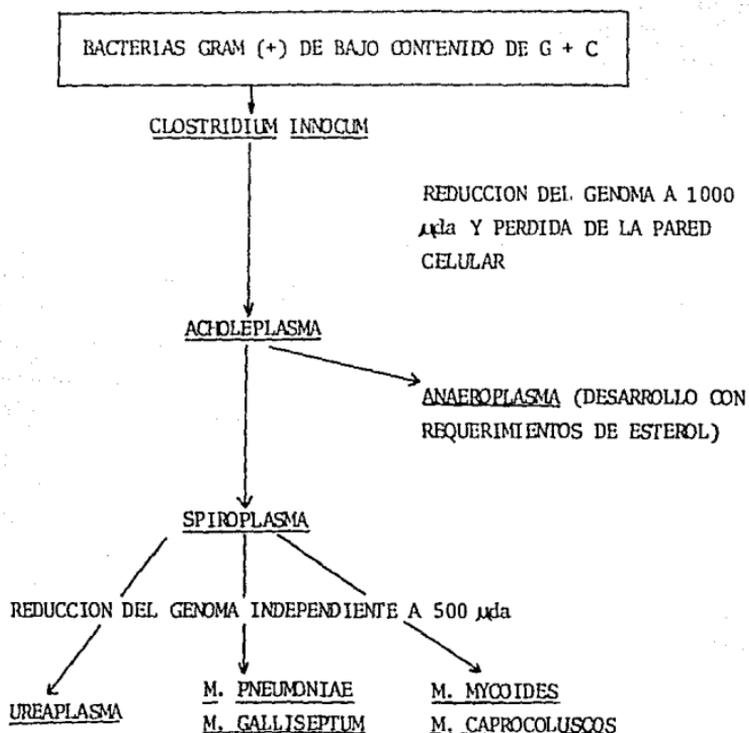
Las personas colonizadas por U. urealyticum con frecuencia no muestran ningún signo de enfermedad por lo que se acepta que el grado de patogenicidad es bajo. La mayoría de los micoplasmas que infectan al hombre y animales se adhieren fuertemente al epitelio del aparato respiratorio y urogenital y rara vez invaden los tejidos y el flujo sanguíneo. Muchas enfermedades causadas por micoplasmas se caracterizan por una inflamación crónica concomitante a la persistencia de organismos viables.

La interacción que guarda el microorganismo con el huésped es extracelular ya que la bacteria se une al receptor celular de ácido neuramínico a través de una estructura especializada puntiforme provocando daño citológico sobre el metabolismo y afectando la movilidad ciliar de las células epiteliales, motivando esto en parte por la formación de peróxido de hidrógeno (11).

Considerando que los micoplasmas no son patógenos intracelulares obligados, llama la atención su capacidad para sobrevivir semanas, meses o años. Así estos microorganismos deben

## CUADRO 2

### ESQUEMA DE LA EVOLUCION DE LOS MYCOPLASMAS



(TOMADA DE RAZIN, 1985)

ser capaces de asegurar en alguna forma su permanencia durante largo tiempo en el huésped evadiendo de alguna manera la respuesta inmunitaria de éste (11). La fagocitosis es probablemente el primer mecanismo que es eludido. Existen pruebas de que M. pulmonis posee una proteína de superficie que le confiere resistencia a la fagocitosis por macrófagos peritoneales, restaurándose dicha actividad en presencia de anticuerpos específicos (11).

Se ha mencionado la producción de sustancias tóxicas que llevarían la destrucción del epitelio con la respuesta inflamatoria aguda o subaguda de la misma, con la consecuente aparición de signos de enfermedad. Los micoplasmas pueden producir endotoxinas y exotoxinas, así como un gran número de productos celulares que son tóxicos para las células hospedadoras. Las condiciones bajo las cuales son elaboradas y sus características químicas no se conocen bien, como tampoco el papel que desempeñan en la patogenia (1).

El micoplasma mejor estudiado en este aspecto es M. neurolyticum, el cual aparece en condiciones naturales, ocasionando una infección latente en el cerebro de ratones, se ha aislado y caracterizado la toxina producida por este microorganismo (11).

U. urealyticum tiene una enzima IgA proteasa que es capaz de fraccionar a la IgA en dos fragmentos Fab y Fc, y esta actividad lo asocia con ciertos patógenos (e.g. N. gonorrhoeae, N. meningitidis, H. influenzae), pues esto ocasiona la deficiente producción de anticuerpos, asegurando su persistencia en la mucosa del aparato urogenital. Tam-

bién se ha visto involucrado por la producción de una fosfolipasa que probablemente participe en los partos pretérmino o ruptura prematura de membranas, desencadenando el parto por la degradación de los lípidos de las membranas fetales y la producción de prostaglandinas (Pollack, Shepard, Masover tabla 3) (1979) (16, 83).

La presencia de U. urealyticum en el aparato genital está íntimamente relacionada con el grado de actividad sexual del individuo. La raza, la fase del ciclo menstrual, la presencia de dispositivos intrauterinos, las malas condiciones higiénicas y el embarazo, podrían participar en la patogenia. El mecanismo íntimo de producción de la enfermedad no se conoce. Existen varias hipótesis para explicar estos hechos de observación (69).

Es posible que las cepas de U. urealyticum sean oportunistas y que su acción patógena surja al combinarse con otros microorganismos, o quizás, al desarrollarse un número significativo de colonias en presencia de ciertos factores predisponentes del huésped. U. urealyticum y G. vaginalis son aislados en el 70% de mujeres embarazadas con problemas renales y en un 20% en mujeres con preeclampsia (65). Estadísticamente significativo es la asociación entre Ureaplasma y la bacteriuria durante el primer trimestre de embarazo y el desarrollo de preeclampsia en el tercero. Esto ha sugerido la persistencia y el crecimiento de ureaplasma en el tracto urinario sea por efecto del estado hormonal permitiendo con más facilidad la colonización del tracto urinario (21, 80, 81).

Se ha especulado que la patogenicidad de las cepas de ureaplasma podrían derivarse de su estructura antigénica o

T A B L A    3

PROPIEDADES DEL UREAPLASMA

CARACTERISTICAS	REACCION O RESULTADO
Formas filamentosas	+
Diámetro celular límites (nm)	100 - 850
Promedio	330
Diámetro colonial (µm)	15 - 60
Requieren para su crecimiento	
CO <sub>2</sub> 5-15%, en N <sub>2</sub> ó H <sub>2</sub>	+
Crece pobremente en condiciones aeróbicas	+
pH óptimo	6.0 † 0.5
Usualmente no se produce más de 10 <sup>7</sup> células viables/ml en caldo de cultivo	+
Medida del genoma (daltons)	4.1 - 4.8 x 10 <sup>8</sup>
G + C de DNA mol%	26.9 - 30.2
Atraviesan filtros de 0.450 µ de diámetro	+
Requiere de colesterol para su crecimiento	+
Sensible a eritromicina y tetraciclina resistente a lincomicina	
<u>Actividad enzimática:</u>	
Ureasa	+
Esterasa	+
Malato deshidrogenasa	+
Lactato deshidrogenasa	-
α-glicerofosfato deshidrogenasa	+
L-histidina amonioliasa	+
Adenosina triptofasa	+
R Nasa	+

CONTINUA TABLA 3

CARACTERISTICAS	REACCION O RESULTADO
D Nasa	+
Fosfatasa	+
Catalasa	-
Actividad proteolítica	+
Fermentación de carbohidratos	-
Hemólisis de eritrocitos (solamente el serotipo 3)	+
Sensible al acetato de Talio	+
Reducción del Tetrazolium (anaeróbico y aeróbico)	-

{TOMADA DE TAYLOR-ROBINSON [83]}.

del tipo serológico del micoplasma. Los principales antígenos de membrana se encuentran en la fracción lipídica y se han identificado en forma parcial como haptenos lipídicos (32).

## COMPOSICION QUIMICA

En los micoplasmas se manifiesta una ausencia completa de ácido  $\alpha$ -diamino pimélico; sin embargo, se ha demostrado que contienen:

LIPIDOS	8-20% DEL PESO SECO
PROTEINAS	40-60% DEL PESO SECO
CARBOHIDRATOS	0.1% DEL PESO SECO

## DIAGNOSTICO

Es evidente que una de las dificultades para el diagnóstico temprano de las infecciones debidas a los micoplasmas es la gran cantidad de especies existentes, más aún si se toma en cuenta que en determinados casos pueden formar parte de la flora normal (1, 13, 43).

De igual manera la ausencia de síntomas más o menos constantes y la falta de hallazgos físicos característicos dificultan todavía más el diagnóstico diferencial que con frecuencia no es fácil establecer particularmente entre una infección por micoplasmas y una provocada por hongos o virus (1).

De allí que su diagnóstico depende de su cultivo en el laboratorio y de que las muestras sean correctamente tomadas y

cultivadas sobre un medio apropiado para su identificación.

## RECOLECCION DE MUESTRAS, TRANSPORTE Y ALMACENAJE

El aislamiento se hace de acuerdo al cuadro clínico a partir de exudado purulentos, secreción prostática, semen, exudado uretral, líquido cefalorraquídeo, secreción vaginal a partir del canal endocervical, productos de aborto, líquido sinovial, orina, sangre (12).

La muestra para cultivo debe ser material verdadero del sitio de infección y debe recogerse con un mínimo de contaminación de tejidos, órganos o secreciones adyacentes.

Para la colección de la muestra se utilizan hisopos que pueden ser de dacrón, algodón o alginato de calcio, estériles; se ha reportado que el uso de palillos de madera en el hisopo puede obstruir la detección de la hidrólisis de la urea en el medio (63).

Una vez colectadas las muestras de orinas si no es posible procesarlas de inmediato se pueden mantener en refrigeración a  $-20^{\circ}\text{C}$ , también pueden preservarse agregándoles conservadores como ácido bórico o dimetilsulfoxido, sin que haya una disminución considerable en la viabilidad. Las muestras de orina deben centrifugarse para aumentar su aislamiento, luego se realiza una dilución 1:10, 1:1000 con el mismo caldo de cultivo, esto ayuda a reducir sustancias que puedan inhibir el crecimiento de ureaplasma. Las muestras de sangre son inoculadas directamente en el medio (12).

No existe por el momento ningún método, en que como con la tinción de Gram pudieramos detectar la presencia de micoplasmas directamente en un frotis de la muestra. Uno de los métodos que podría utilizarse con este fin es la inmunofluorescencia, utilizando antisueros específicos como anticuerpos monoclonales (12).

Para su identificación y aislamiento en el laboratorio se han formulado una gran variedad de medios para su cultivo, que son sólidos, líquidos, así como bifásicos, entre los comúnmente utilizados se encuentran: el agar PPLO, agar NYC, agar E, el caldo y agar A7, caldo 10 B, caldo 17 B y los medios bifásicos como son el Mycotrim-GU y el H (20, 35, 37, 55, 58, 61, 87).

Los requerimientos principales para su cultivo se pueden resumir en cuatro componentes:

- a) Contienen peptonas, en general se utiliza la peptona de soya tripticasa, que contiene un alto nivel de vitaminas especialmente tiamina.
- b) Requieren de suero de caballo, que es la fuente principal de colesterol para la síntesis de membrana, se utiliza en una concentración de 10-20% en los medios de cultivo, además de ser necesario para su crecimiento, ayuda para evitar la formación de pseudocolonias en el medio.

Además del suero de caballo, es necesario agregar extracto de levadura en una concentración de 10%,

éste actúa como el precursor de ácidos nucleicos.

- c) La urea es un componente que debe integrarse al medio de cultivo, se requiere en una concentración de 0.03-0.1%, los ureaplasmas poseen la enzima ureasa que hidroliza la urea con la consiguiente formación de amoniaco. Por lo que al medio se le agrega un indicador de pH, es en este caso el rojo de fenol que detectara cuando el medio se alcalinice en presencia de amonio, se utiliza en una concentración de 0.03-0.1%.
- d) Los antibióticos son importantes para evitar contaminaciones con otro tipo de bacterias y hongos, principalmente ureasa-positivos como algunas especies de Proteus o Rhodotorula, que al desarrollarse inhiben el crecimiento de Ureaplasma y nos den un resultado equivocado. Los antibióticos utilizados son penicilina (sol. stock 100,000 U/ml), kanamicina (20  $\mu$ /ml), anfotericina B (5  $\mu$ /ml), o nistatina (50 U/ml) (35).

La anfotericina B a la concentración de 5  $\mu$ /ml se ha reportado como inhibitoria en algunos casos (20).

U. urealyticum es susceptible a eritromicina y resistente a la lincomicina. M. hominis es resistente a eritromicina y susceptible a lincomicina, estas diferencias son utilizadas para diferenciarlos en los cultivos (38).

Es necesario además conservar un medio hiperosmótico para esto se agrega NaCl al 0.05%, el suero de caballo también contribuye para ésto.

Los hisopos deben inocularse directamente al medio se incuban a 37°C en medio líquido crecen en condiciones atmosféricas, pero sobre el agar las colonias se desarrollan a una concentración de CO<sub>2</sub> 5% y N<sub>2</sub> 95%, esto también ayuda a inhibir el crecimiento de hongos o bacterias aeróbicas y además ayuda a incrementar en el número de aislamiento.

Los cultivos deben ser observados diariamente, varias veces al día, cuando menos dos, en cuanto se observe el cambio de color en el medio de amarillo a rojo, Ureaplasma crece en un rango de pH de 5.5 a 6.5. Una de las características de su crecimiento en el medio de cultivo que al desarrollarse no se aprecia turbidez, ni formación de sedimento, Se obtiene un crecimiento rápido en las primeras 16 horas de incubación, los títulos no exceden de 10<sup>6</sup> UFC/ml (67).

Ahora después de que el tubo de cultivo a virado, se toma 0.1 ml, se subcultiva en nuevo caldo urea sin antibióticos; y sobre el medio sólido, agar E donde también se inocula con 0.1 ml del cultivo positivo y se incuba a 37°C en microaerofilia (CO<sub>2</sub>5%), al tercer día de incubación se observan las cajas con ayuda de un microscopio estereoscópico, observándose de la superficie al fondo del agar, en busca de las colonias características. Un rasgo diferencial de las colonias de U. urealyticum con los otros micoplasmas es que no presentan la forma típica de "huevo frito", ya que éstas crecen totalmente dentro del agar y debido a su pleomorfismo pueden agruparse en cadenas, en pares y son fáciles de confundir con artefactos del medio (12, 43).

Para poder distinguir perfectamente las colonias podemos utilizar la Tinción de CaCl<sub>2</sub> (también llamada prueba de ureasa)

para esta prueba se utiliza un reactivo que contiene urea (0.1 M) y un indicador de amonio, el  $\text{CaCl}_2$  (0.1M). Esta prueba se basa en la detección de la actividad de la enzima ureasa que al hidrolizar la urea produce amonio, el cloruro de calcio reacciona con éste, formando un precipitado sobre las colonias, que es un óxido metálico ( $\text{Ca O}_2$ ) que da un color castaño oscuro a las colonias de Ureaplasma, el reactivo se aplica directamente a las colonias y se observa la reacción a los cinco minutos (46, 67, 85). La prueba debe efectuarse en crecimiento de 48 horas, por que la actividad de la ureasa no se puede detectar después de tres días. Las especies de Mycoplasmas, Acholoclasma y las formas L de Proteus no dan esta reacción (67).

Otra opción para diferenciar las colonias de Ureaplasma de otros micoplasmas y artefactos del medio, es la tinción de Dienes, con ésta los micoplasmas ureasa-negativos se tiñen de azul, Ureaplasma no se tiñe y los organismos no viables y artefactos no se tiñen o toman un tono violeta (43, 67).

Originalmente el indicador en la tinción de  $\text{CaCl}_2$  era el cloruro de manganeso ( $\text{MnCl}_2$ ) a una concentración de 0.8%, pero estudios realizados por Robertson y Chen, en la que se determina la influencia del manganeso en el crecimiento de Ureaplasma, reportaron que ciertos serotipos son sensibles a una concentración de  $\text{MnCl}_2$  de 1.0 mM esto ha sido utilizado para clasificar a los serotipos, en dos biotipos. El primero incluye a los serotipos 1, 3, 6 y 14 que son inhibidos por el manganeso temporalmente en su crecimiento, el segundo biotipo incluye a los serotipos, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11 y 12, donde su crecimiento se inhibe completamente (58).

La prueba se ha tratado de implementar como se hace la prueba de oxidasa, utilizando discos impregnados con el reactivo de Feigl, que es una mezcla de nitrato de plata y nitrato de manganeso que al estar en contacto con el amonio, el papel se va obscureciendo (67).

Un cultivo no puede darse como positivo si sólo el caldo ha virado; se reporta una vez localizadas las colonias en las cajas.

La viabilidad de los cultivos va disminuyendo conforme aumenta la alcalinidad del medio, U. urealyticum sobrevive alrededor de 12 horas, después del cambio de color y las colonias sobre el agar permanecen viables alrededor de dos días después de su aparición.

Para determinar el tiempo óptimo para transferir a caldo nuevo es cuando se inicia el cambio de color. Integrandolo al medio una solución amortiguadora de pH puede prevenir un incremento de la alcalinidad y la subsecuente baja de la viabilidad, el amortiguador óptimo es el MES (ac. 2-N-morfolino etanosulfónico), se utiliza en una proporción de amortiguador y urea en el caldo de cultivo de 2:1 a 4:1 (i.e. 10 a 20 mM MES pH: 6.3 a urea 5 mM), para el agar en una relación de 10:1 de amortiguador y urea (i.e. 30 mM MES pH: 6.3 a 3 mM de Urea). La adición de un agente reductor (como el sulfito de sodio 11 mM) al medio de cultivo reduce la fase lag, pero no totalmente. Uno de los inconvenientes de usar el amortiguador de pH es que el suero de caballo con que se enriquece el medio, es rico en el contenido de bicarbonatos lo cual eleva el pH del medio después de incubarse en CO<sub>2</sub> (12).

## DESCARTAR LAS FORMAS-L

En las placas de cultivo pueden crecer colonias similares a las de Mycoplasma, originadas por diferentes tipos de bacterias, entre las que se incluyen enterobacterias, cocos piógenos, bacilos Gram (+), bacteroides y estreptobacilos. Su formación se debe a la existencia en el medio de altas concentraciones de sales y penicilina. Los organismos en tales colonias, que son pleomórficos y se tiñen débilmente por los colorantes, se han denominado Formas L. Estas pueden considerarse como derivadas más que contaminantes de los cultivos bacterianos, puesto que la mayor parte de ellos podrán revertir a su forma original, cuando el antimicrobiano se elimina del medio, algunas cepas revierten inmediatamente a su estado bacteriano habitual, mientras que otras siguen creciendo como formas L (43).

## ASPECTOS INMUNOLOGICOS

Se han propuesto mecanismos mediante los cuales los micoplasmas pueden evadir la respuesta inmunitaria, como la producción deficiente de anticuerpos, que se producen localmente en los epitelios mucosos; su adherencia a los macrófagos impidiendo la fagocitosis; la alteración de la respuesta de los linfocitos y variación antigénica (11).

La fagocitosis es probablemente el primer mecanismo que es eludido. Existen pruebas de que M. pulmonis posee una proteína de superficie que le confiere resistencia a la fagocitosis por macrófagos peritoneales, restaurándose dicha actividad en presencia de anticuerpos específicos (11).

Taylor-Robinson y cols. (1974), tomaron dos grupos de ratones, a uno de ellos le quitaron el timo y los irradiaron con rayos X, mientras que el otro no fue inmunosuprimido; a ambos grupos los inocularon con una misma cantidad de M. pulmonis por vía intravenosa. Observaron que el grupo de animales inmunosuprimidos presentó artritis más grave, lo cual les sugirió que la ausencia de linfocitos pudiera estar acompañada con un aumento en la diseminación de micoplasmas a articulaciones y a otros sitios como hígado y sangre, ya que estos microorganismos se aislaron con más frecuencia de estos sitios en animales inmunosuprimidos (22).

En 1983 Biberfeld y cols., probaron la capacidad de Mycoplasmas pneumoniae para activar linfocitos de sujetos clínicamente sanos y de personas con neumonía. Ambos tenían títulos de anticuerpos contra rubéola, varicela, parotiditis sugerentes de infecciones previas causadas por este virus.

Al poner como estimulador de linfocitos de personas clínicamente sanas a M. pneumoniae, se observó que éste indujo la producción de anticuerpos virales del tipo IgG contra aquellos virus a los que el donador se sabía tenía anticuerpos en suero; se observó a su vez, que la producción de anticuerpos fue dependiente de T. Mientras que linfocitos de pacientes con neumonía por M. pneumoniae recolectados nueve a trece días después de la fase aguda de la enfermedad, en ausencia de un agente estimulador produjeron en forma espontánea anticuerpos contra varicela, rubéola o el virus de la parotiditis, sugiriendo que M. pneumoniae puede llevar a una activación "no específica" de células B de memoria in vivo.

Gideoni y colaboradores (1984) al estudiar la interacción de micoplasmas y macrófagos observaron que la estimulación mitogénica de los linfocitos por M. pneumoniae no indujo la liberación in vivo de linfocinas capaces de aumentar la muerte de los microorganismos infectivos por macrófagos peritoneales, favoreciendo la persistencia del microorganismo (11).

La falta de pared celular de los micoplasmas le permite a su membrana establecer un contacto íntimo con la membrana del hospedero. A pesar de que no hay evidencias claras que sostengan que existe fusión de las dos membranas, hay indicaciones de que se puede llevar a cabo una transferencia de material antigénico, entre micoplasmas y membranas de las células hospederas. Se ha observado que cuando M. hyorhinis crece acompañado a linfoblastos murinos, los organismos adquieren selectivamente los antígenos H-2K<sup>k</sup> de histocompatibilidad y el antígeno de diferenciación Thy 1.1 (11).

Se ha observado de manera muy especial, la implicación patológica del U. urealyticum sobre algunos pacientes inmuno suprimidos. Taylor-Robinson logró su aislamiento del líquido sinovial de un joven con hipogammaglobulinemia (11, 84).

Foulon W. y cols., reportaron un caso en el que se presentó ruptura prematura de membranas, amnionitis, aborto y septicemia en una paciente con 21 semanas de gestación, donde el único germen aislado en los cultivos fue U. urealyticum. En el perfil inmune se presentó alteración de la relación de OKT4/OKT8 y decremento de los niveles de IgG. Estas alteraciones se normalizaron después de cuatro semanas de presentarse el aborto (22).

Por lo expuesto, se puede pensar que los micoplasmas pueden valerse de diferentes medios para permanecer durante largo tiempo colonizando el tejido mucoso y aún más, diseminarse a otros sitios alejados de los epitelios del aparato respiratorio y urogenital. Así se sabe que M. pneumoniae ha sido aislado de sangre de ventrículos y líquido de pericardio en personas con septicemia y de líquido cefalorraquídeo. Así se sabe que M. hominis se ha aislado de sangre, líquido cefalorraquídeo y abscesos cerebrales, U. urealyticum ha sido recuperado de sangre, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo y productos de aborto (22, 38, 67).

Las pruebas serológicas para tipificar al U. urealyticum son diversas, entre las más utilizadas se encuentran:

- La prueba de inhibición del metabolismo.
- Inhibición del crecimiento en el medio sólido (GI)
- Mycoplasmacida
- Hemaglutinación indirecta (IHA)
- Inmunoperoxidasa indirecta (IP)
- La prueba de inmunoensayo enzimático (ELISA)

Con la prueba de inhibición del metabolismo y/o crecimiento (GI) y por IHA, se han identificado 8 serotipos (Ford y Black); por inmunofluorescencia catorce y por la técnica de Mycoplasmacida 16 (12).

PRUEBA DE INHIBICION DEL CRECIMIENTO (GI).- Para esta prueba se utilizan placas de agar A7 a las cuales se les han incorporado los antisueros específicos contra los ocho serotipos de ureaplasma, además se les adiciona cultivos de

U. urealyticum de 18 horas en fase logarítmica de crecimiento; posteriormente se le agrega una dilución del suero problema, este se incuba y se leen las zonas donde se inhibe el crecimiento (32, 38, 45). Esta prueba es específica y constituye una de las pruebas para la separación de las diferentes especies de micoplasmas.

INHIBICION DE METABOLISMO.- El fundamento de esta prueba es el mismo que en la prueba anterior, pues se utilizan antisueros específicos que inhiben el crecimiento donde se encuentre serotipo homólogo y a diferencia de la prueba de inhibición de crecimiento, ésta se realiza en medio líquido (38, 45).

INMUNOENSAYO ENZIMATICO (ELISA). Esta prueba se realiza a partir del suero de los pacientes, para detectar anticuerpos IgG, IgM e IgA contra Ureaplasma. Esto último representa ventajas notables ya que se pueden obtener los resultados en cuatro horas, son reproducibles y con solo 10 µl/ml del suero problema (23, 63).

PRUEBA DE INMUNOPEROXIDASA INDIRECTA (IP). Consiste en hacer reaccionar las colonias de ureaplasma en el agar con antisueros específicos y luego se agrega un conjugado anti-suero de conejo-peroxidasa que al reaccionar con una solución de 3, 4, 3', 4' tetra-aminodifenil hidrocloreuro (DAB) que al reaccionar con la enzima peroxidasa da como resultado un cambio de color en la superficie de las colonias en el agar, se observa la tinción con ayuda del microscopio estereoscópico (70).

Se ha tratado de determinar que serotipo en especial es el más frecuente en algunas de las enfermedades producidas por Ureaplasma urealyticum, pero se ha visto que en una enfermedad se puede aislar más de un serotipo y de la misma localización.

Shepard y Lunceford (1978), aplicando el método de inhibición del Crecimiento (GI) para la serotipificación de 338 muestras de pacientes con uretritis no gonocócica (UNG) y de pacientes con infecciones del tracto urinario sintomáticos y asintomáticos, encontrando frecuentemente asociado al serotipo 4 en estos pacientes (41). Hewish y cols., en 1986 investigaron la presencia de Ureaplasma y la serotipificación de éste por inmunofluorescencia, en las muestras obtenidas de pacientes con infecciones del tracto urinario dilucidando que el serotipo que predominó más fue el VI, siguiendo en frecuencia el serotipo V y VII. Los datos son insuficientes hasta ahora para determinar que serotipo es el responsable para alguna enfermedad específicamente.

La incidencia de anticuerpos contra M. hominis o de Ureaplasma es directamente relacionada a la edad; pocos individuos prepúberes presentan anticuerpos específicos pero la incidencia se incrementa durante la adolescencia, al inicio de la vida sexual y el 50 a 90% en adultos tienen anticuerpos contra estos microorganismos (42, 82).

## ASPECTOS CLINICOS

Durante la última década Ureaplasma urealyticum ha sido asociado como agente causal de la uretritis no gonocócica y

enfermedades inflamatorias de la próstata, vagina, cuello uterino, sistema urinario superior y órganos pélvicos femeninos. Además la colonización por ureaplasma se ha acompañado de infertilidad en el hombre y mujer, aborto habitual, y producción recurrente de lactantes prematuros con peso bajo al nacimiento.

Los lactantes son colonizados durante el nacimiento, pero el transporte del microorganismo se pierde durante el primer año de vida. Después de esto, la prevalencia de colonización aumenta con la edad y la experiencia sexual, lo mismo se observa con otros microorganismos transmitidos por el sexo. En todas las edades, las mujeres son al parecer más fácilmente colonizadas que los hombres, y la frecuencia es mayor en sujetos de los grupos socioeconómicos inferiores (32, 45).

INFECCION DE LAS VIAS URINARIAS INFERIORES.- U. urealyticum y M. hominis se encuentran ampliamente diseminados aislándose en el tracto urinario de enfermos de clínicas de enfermedades de transmisión sexual, donde la incidencia es alta. U. urealyticum se aísla en un 81% de los hombres con uretritis no gonocócica en los cuales los aislamientos de Chlamydia son negativos y sólo el 2% de los hombres sin uretritis (45). Este tipo de problema tiene una expresión menos importante en la mujer comparada con lo que acontece en la población masculina.

INFECCION DE LAS VIAS URINARIAS SUPERIORES.- M. hominis s. ha aislado de los riñones y uréteres de pacientes con pielonefritis clínica. Se han descubierto anticuerpos contra

microorganismos en el suero y orina de algunos de estos pacientes, proporcionando una prueba bastante importante en el sentido de que M. hominis produce algunos casos de pielonefritis (77). No se ha observado infección por U. urealyticum en pacientes con pielonefritis, pero este agente está involucrado en la formación de cálculos urinarios, pero los ureaplasmas han sido aislados de uréter, de la corteza y médula renal de pacientes con cálculos (36). Cabría esperar esta relación dada la capacidad del microorganismo para metabolizar urea a amoniaco, produciendo orina alcalina en la cual el calcio es poco soluble, favoreciendo la formación de cálculos de fosfato de amonio-magnesio, riesgo que comparte con algunas bacterias Proteus también asociadas con formación de cálculos en orina (46, 49, 77).

MICOPLASMAS Y ANORMALIDADES REPRODUCTIVAS.- En pacientes con esterilidad, se ha encontrado en uno u otro o ambos de lapareja, que los micoplasmas están colonizando el área urogenital. La recuperación de ureaplasmas del esperma de varones con trastornos de la fertilidad, ha permitido estudiar algunos hallazgos: baja movilidad en los espermatozoides, presencia de formas aberrantes, disminución en el número y lo más importante, mejoría de esas alteraciones después de recibir el tratamiento.

INFECCION PUERPERAL.- Los micoplasmas presentes en el área cervicovaginal o urogenital durante y después del parto, pueden ser causa de aborto séptico, fiebre posaborto o posparto. Cuando se han tratado de cultivar los micoplasmas en pacientes con fiebre posaborto o posparto, se ha probado su presencia del 5 al 8% de esas pacientes, en contra de cero

casos con aislamiento en embarazos normales (31, 47, 77).

## INFECCIONES PERINATALES

Se han documentado casos de colonización por ureaplasmas y M. hominis, relacionados con aborto espontáneo habitual. Los gérmenes han sido aislados como únicos patógenos en el corion, amnios y la decidua. Igualmente se han aislado los mismos agentes de los órganos internos de fetos abortados espontáneamente. No se han aislado de fetos, producto de abortos inducidos. La administración de fármacos a mujeres colonizadas en área cervicovaginal y con antecedentes de aborto habitual, ha reducido la frecuencia de abortos (32).

Los micoplasmas en el área cervicovaginal durante la gestación, son riesgo potencial de corioamnionitis y deciduitis, cambios patológicos que pueden ser adjudicados a estos micoplasmas genitales, lo cual se relaciona directamente con ruptura prolongada de membranas, parto pretérmino y prematuridad con bajo peso. La infección prolongada que invade las membranas fetales, puede interferir con la nutrición fetal y/o iniciar el parto prematuro. Cuando se ha muestreado a niños de bajo peso y prematuros, comparándolos con niños normales se ha encontrado que los primeros tienen mayor frecuencia de colonización en fosas nasales y orofaringe. Estos datos apoyan la relación de prematuridad y colonización por micoplasmas (4, 16, 17, 22, 25, 68).

La repercusión de la colonización, infección o enfermedad en la embarazada, tiene un riesgo potencial no despreciable para el neonato. En últimas fechas se ha documentado la

etiología por U. urealyticum en un cuarto o quinto lugar de la neumonía de niños menores de tres años, situación que obliga a tener en cuenta esta posibilidad en infección respiratoria neonatal o posnatal (56).

## TRATAMIENTO

Los micoplasmas que afectan genitales son sensibles in vitro a tetraciclina, cloranfenicol, aminoglucósidos y clindamicina; y son resistentes a penicilinas y cefalosporinas.

U. urealyticum es sensible a eritromicina, pero M. hominis no lo es.

El tratamiento indicado en las infecciones por U. urealyticum es tetraciclina debido a que esta actúa inhibiendo la síntesis de proteínas ya que se une a la subunidad ribosomal 30s. Tratándose a los pacientes con clorhidrato de tetraciclina la dosis es de 2 g cada 24 horas, durante 10 días. En caso de utilizar la doxiciclina se administran 200 mg cada 24 horas durante 10 días mínimo.

Durante el embarazo está contraindicado el uso de tetraciclina o sus derivados. En estas condiciones se indicará eritromicina (base o estearato) a dosis de 500 mg cada 8 horas durante 10 días. Si se presentaran reacciones de intolerancia, se podrá administrar la mitad de la dosis en el doble de tiempo que durará el tratamiento (1, 32).

El tratamiento debe ser simultáneo, es decir, a la (s) pareja (s) sexual (es), esto disminuye e impide las recidivas.

Tradicionalmente los ureaplasmas considerados universalmente susceptibles a tetraciclinas con una MIC  $\leq$  1.0  $\mu$ g/ml, pero a partir de 1974 se ha visto la aparición de cepas resistentes de los aislamientos obtenidos (38, 45).

Se ha comprobado que son moderadamente susceptibles ha algunas quinolonas in vitro, ahora se comprueba in vivo. La fluorofamida es un potente inhibidor de ureasa y muestra ser un potente inhibidor de las cepas resistentes a tetraciclina.

## O B J E T I V O S

- Establecer la frecuencia de colonización cervico vaginal por Ureaplasma urealyticum en mujeres embarazadas con y sin patología cervicovaginal (leucorrea).
- Establecer la frecuencia de colonización cervico vaginal por Ureaplasma urealyticum en mujeres no embarazadas con y sin patología cervicovaginal.

## MATERIAL Y METODOS

### MATERIAL UTILIZADO

Asa de inoculación

Mechero de Bunsen

Matraces Erlenmeyer de 100, 250, 300 ml

Vasos de precipitados de 50, 100 ml

Tubos de ensaye con tapón de rosca de 16 x 150 mm

Tubos de ensaye con tapón de rosca de 16 x 125 mm

Cajas de Petri de 100 x 15 y de 35 x 12 mm

Pipetas Pasteur

Pipetas graduadas de 1.0, 5.0 y 10.0 ml

Gradillas

Hisopos estériles (de algodón o alginato de calcio)

Incubadora (37°C)

Jarra de incubación de CO<sub>2</sub>

Microscopio estereoscópico

Cinta adhesiva

Cinta testigo

Marcadores

## REACTIVOS UTILIZADOS

Cloruro de Sodio  
Rojo de Fenol  
Anfotericina B  
Penicilina G sódica  
Kanamicina  
Urea  
Cloruro de Calcio  
Agua desmineralizada  
Digestivo papaínico de harina de soya  
Agar-agar purificado exento de inhibidores  
Sulfato de Magnesio  $7 H_2O$   
Sacarosa  
Levadura Fleischman  
Suero de caballo estéril completo o desgama globulinizado

## MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

Caldo Urea con antibiótico y sin antibiótico  
Agar E  
Medio L  
Gelosa Sangre al 5%  
Biggy

## METODOLOGIA

### A) POBLACION ESTUDIADA

Para el estudio se formaron dos grupos de un total de 754 pacientes que fueron atendidas en el Servicio de Infectología del Instituto Nacional de Perinatología (INPer), durante el período que comprendió de agosto de 1986 a septiembre de 1987.

Se trabajó con pacientes sintomáticas, con leucorrea crónica, cistitis y vaginosis bacteriana.

El grupo en estudio fue formado por 380 mujeres embarazadas, cuya edad promedio fue de  $28.6 \pm 5.89$  (SD) años y edad gestacional promedio de  $29.04 \pm 6.28$  semanas. El grupo control fue formado por 374 mujeres no embarazadas sexualmente activas, cuya edad promedio fue de  $25.48 \pm 4.75$  años.

Los criterios para incluir a las participantes en el estudio fueron:

- Tener vida sexual activa o estar embarazada, según el grupo.
- No haber recibido tratamiento antimicrobiano 10 días antes de la consulta.
- Tener o no patología cervicovaginal.
- Aceptar su participación en el estudio.

## B) TOMA DE MUESTRA

Para la obtención de muestras, se instruyó a la paciente para que se hiciera un aseo de genitales externos previos a la consulta, evitando cualquier tratamiento local o lavado vaginal.

Se colocó a la paciente en posición ginecológica, introduciéndose en la vagina un espejo estéril sin lubricante; una vez localizado el cuello uterino, se fijó el espejo abriendo las valvas y se tomó la muestra con un hisopo estéril del endocérvix; con un segundo hisopo, se toma una muestra del fondo de saco, introduciendo cada hisopo en un tubo que contenía 3 ml de caldo Urea, dejándolo en su interior durante 30 minutos, para luego descartarlos e incubar los dos tubos a 37°C, durante las siguientes 18-24-48 horas.

En la figura 3 se describe el procesamiento de las muestras.

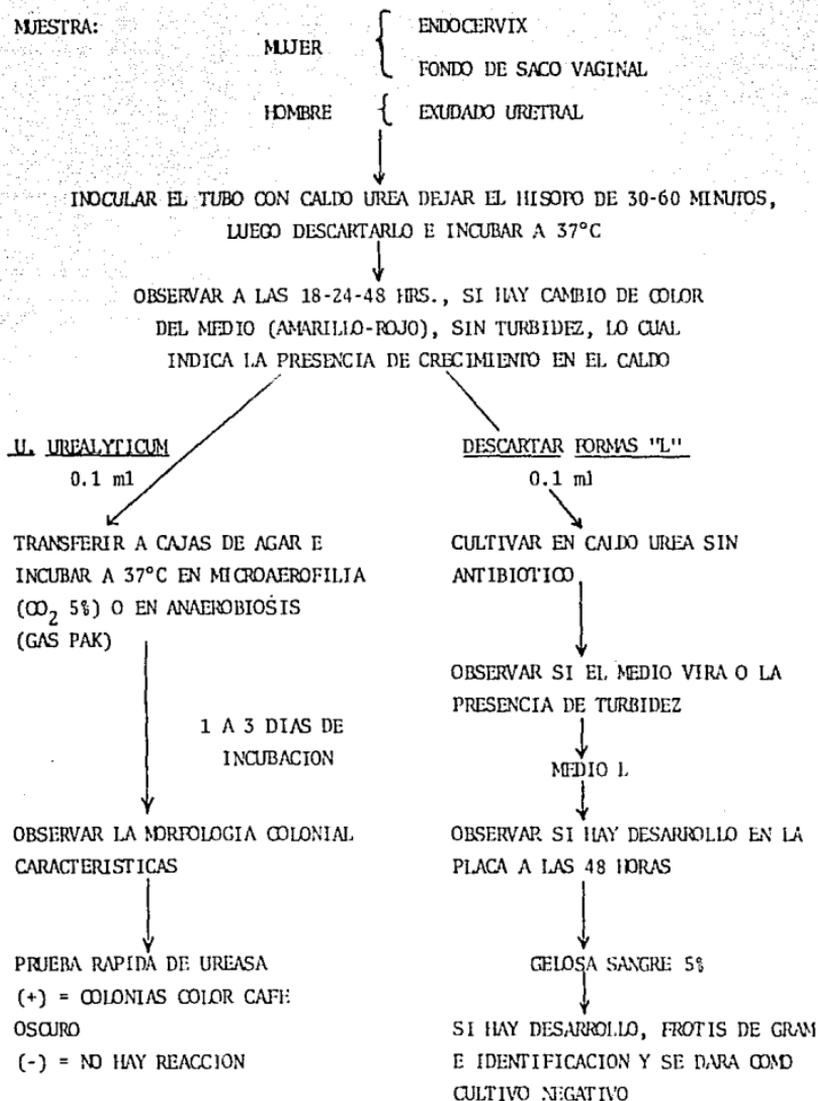
## C) AISLAMIENTO E IDENTIFICACION

### Uraplasma urealyticum

Para la toma de muestras, procesamiento, conservación, cultivo, observación e identificación, se siguió lo establecido en: Clyde W.A., Kenny G.E., Schachter J: Laboratory Diagnosis of Chlamydial and Mycoplasmal Infections. CUMITECH N° 19. American Society for Microbiology 1984.

- Las muestras recolectadas de endocérvix y de

FIG. 3. Esquema de aislamiento de Ureaplasma urealyticum en el tracto genital masculino y femenino.



fondo vaginal, utilizando un hisopo para cada una de ellas.

- Colocar el hisopo vaginal (B) y el cervical (A) en tubos con caldo Urea (conteniendo 3 ml).
- Dejar incubar cada tubo con el hisopo a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Posteriormente sacar el hisopo de cada tubo descargando el inóculo por rotación suave. Descartar el hisopo e incubar el caldo a 37°C en estufa, de 1 a 3 días.
- Observar a las 18-24-36-48 horas el cambio de color del indicador adicionado al caldo urea (de amarillo a rojo), lo cual indica la presencia de crecimiento en el caldo (sin turbidez).

Al comprobar el crecimiento en el tubo:

- a) Tomar 0.1 ml del caldo con pipeta Pasteur y descargar el inóculo sin romper el medio en una placa conteniendo 3 ml de agar E (hacer este procedimiento para muestra vaginal y cervical). Incubar las placas a 37°C en microaerofilia (CO<sub>2</sub> 5%) o en anaerobiosis (Gas Pak).
- b) Después de tres días de incubación las cajas de agar E se examinan con ayuda del microscopio.

pio estereoscópico se observa la superficie del agar en busca de la morfología colonial característica correspondiente a Ureaplasma urealyticum.

#### REALIZAR LA PRUEBA DE UREASA

A las placas con medio sólido se les agrega una gota del reactivo de urea e inmediatamente después observar al microscopio el cambio de color de las colonias (café-negrusco) que se interpreta como prueba (+), confirmando que estas colonias se tratan de ureaplasma.

#### DESCARTAR FORMAS L

En otro tubo con caldo urea (conteniendo 3 ml), sin antibióticos, se agrega 0.1 ml del caldo del tubo con crecimiento, incubar a 37°C.

Hacer observaciones a las 18-24-36-48 horas, hasta el viraje del indicador en el caldo y se aprecia si existe turbidez. De este tubo se toma una asada y se siembra sobre el medio L, incubar en la estufa a 37°C y observar si hay desarrollo en la placa. Si esto ocurre se hace una resiembra del crecimiento en una placa de Gelosa Sangre al 5%, si hay crecimiento se realiza un frotis y tinción de Gram se identifica. De esta manera se evita dar resultados falsos positivos.

## ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos, se empleó la prueba de chi-cuadrada ( $X^2$ ), utilizando tablas de contingencia. Asociando con un valor de  $p$  a un nivel de significancia de 0.05.

Recordando que la prueba de chi-cuadrada ( $X^2$ ) puede ser empleada para determinar de que forma distribuciones teóricas tales como normal, binomial, etc., se ajustan a distribuciones empíricas, es decir aquellas que se obtienen de datos muestrales. Por lo tanto lo que realiza la prueba de  $X^2$  es una confrontación entre lo observado en una situación concreta y lo esperado basándose esto en las respectivas frecuencias.

## RESULTADOS

De las 754 pacientes incluídas en el estudio Ureaplasma urealyticum fue aislado en 82 de las 380 mujeres que conformaban el grupo de embarazadas y solo se obtuvieron 61 cultivos positivos en el grupo de no embarazadas. En el grupo de mujeres embarazadas la frecuencia de colonización fue más alta (21.5%) que en no embarazadas (16.3%), pero la diferencia no es estadísticamente significativa (tabla 1) (gráficas 1 y 2).

La tabla 2 describe la distribución de U. urealyticum en los cultivos positivos de ambos grupos, relacionando el sitio de su aislamiento. Como observamos se recuperó en mayor número de cultivos de cérvix, en el grupo de mujeres embarazadas

(12.12%) y en el de no embarazadas (6.15%), pero al comparar los dos grupos no existe una diferencia significativa. Esto concuerda con lo reportado en la literatura (84), que es más frecuente recuperarlo de cérvix.

La tabla 3 representa a las mismas pacientes colonizadas con Ureaplasma urealyticum en relación al promedio de edad, inicio de vida sexual activa y edad gestacional promedio. Como observamos en la tabla, no hay gran diferencia entre los dos grupos en cuanto a estos parámetros, solo al comparar la edad promedio en que inician su vida sexual activa, se observa que es más temprana en el grupo de mujeres no embarazadas ( $16.8 \pm 6.20$  (SD) vs  $20.5 \pm 4.26$  años,  $t = 3.14$ ,  $gl:60$ ,  $p < 0.001$ ).

El promedio del tiempo para la detección de cultivos positivos de U. urealyticum, fue de 1.5 días en caldo Urea y 3 días sobre el agar E..

T A B L A 1

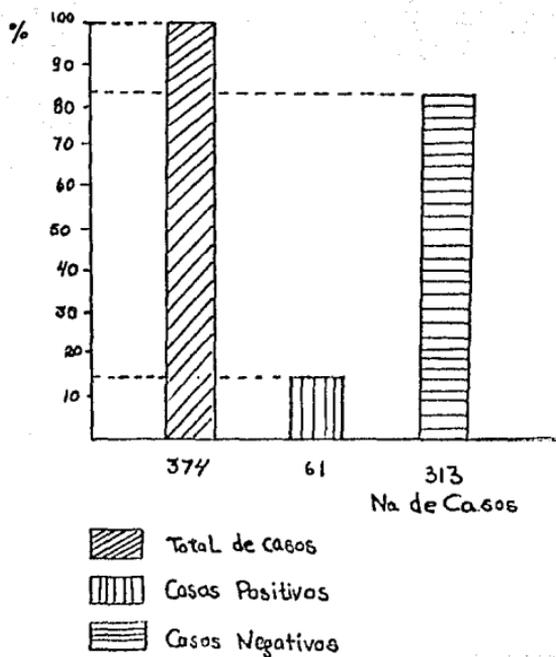
PREVALENCIA DE COLONIZACION DE UREAPLASMA UREALYTICUM  
EN MUJERES EMBARAZADAS Y NO EMBARAZADAS

GRUPO	CULTIVOS POSITIVOS		%	RIESGO RELATIVO	p#
	Nº de pacientes	Nº total			
EMBARAZADAS	82	380	21.5	1.4	NS'
NO EMBARAZADAS	61	374	16.3	1.4	NS

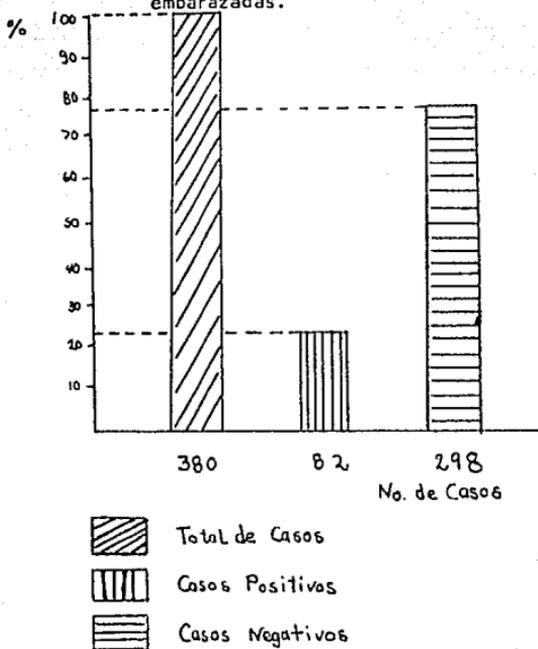
\*  $\chi^2$  = CHI CUADRADA

' NS = NO SIGNIFICATIVO

GRAFICA 1. Recuperación de U. urealyticum de las muestras procedentes del grupo de no embarazadas.



GRAFICA 2. Recuperación de U. urealyticum de las muestras procedentes del grupo de embarazadas.



T A B L A 2

RECONOCIMIENTO DE U. UREALYTICUM EN AMBOS GRUPOS  
DE MUESTRAS TOMADAS DE CERVIX Y FONDO DE SACO VAGINAL

SITIO DE AISLAMIENTO	CULTIVOS POSITIVOS		P*
	EMBARAZADAS	NO EMBARAZADAS	
CERVIX Y VAGINA	25	25	NS <sup>1</sup>
CERVIX	46	23	NS
FONDO DE SACO VAGINAL	11	16	NS

\*  $\chi^2$  = CHI CUADRADA

<sup>1</sup> NS = NO SIGNIFICATIVO

T A B L A 3

PACIENTES COLONIZADAS CON U, UREALYTICUM, EMBARAZADAS Y  
 NO EMBARAZADAS EN RELACION AL PROMEDIO DE EDAD, INICIO  
 DE VIDA SEXUAL ACTIVA, EDAD GESTACIONAL PROMEDIO

	EMBARAZADAS	NO EMBARAZADAS
EDAD PROMEDIO (AÑOS)	28.67	25.48
INICIO DE VIDA SEXUAL ACTIVA (AÑOS)	20.5	16.8
EDAD GESTACIONAL PROMEDIO (SEMANAS)	29.04	- -

## D I S C U S I O N

U. urealyticum junto con M. hominis, colonizan con frecuencia los órganos genitales masculino y femenino. Durante el último decenio, ha suscitado creciente interés el saber el papel que estos microorganismos podrían desempeñar en la producción de enfermedad del aparato genitourinario (46, 47, 77).

Estudios previos reportan (22) que la prevalencia de colonización por micoplasmas, se ve influenciada por los siguientes factores: edad, raza, estado hormonal, nivel socioeconómico y experiencia sexual (31, 46, 47, 77).

Posterior a la pubertad, la colonización primaria con micoplasmas ocurre como resultado del contacto sexual. Individuos sexualmente maduros sin historia de relaciones sexuales, excepcionalmente están colonizados con estos microorganismos.

La frecuencia de la colonización aumenta en relación directa con la actividad sexual y fundamentalmente con el número de compañeros diferentes (48). McCormack y colegas (22); han encontrado que un 35% de las mujeres con una pareja sexual son portadores de Ureaplasma mientras que las que tienen tres o más parejas presentan tasas de colonización en un 75%.

En otros estudios McCormack y cols. (46) ha encontrado relacionado una mayor tendencia de colonización por U. urealyticum en grupos de nivel socioeconómico bajo. En el

estudio realizado en la ciudad de Boston, M. hominis fue aislado en el 53.6% y Ureaplasma en el 76.3% de las mujeres que acudían a la consulta ginecológica del hospital municipal, comparándolo con el 21.3% y 52.9% respectivamente en las pacientes que acudieron a las clínicas obstétricas privadas en la misma área de estudio (52).

Braun y cols. (3), reportaron que U. urealyticum y M. hominis estuvieron presentes en cultivos vaginales, conjuntamente o por separado en el 80% de las mujeres embarazadas atendidas en la clínica de cuidados prenatales en la Ciudad de Boston. Diferentes investigadores señalan la presencia de Ureaplasma en la mujer embarazada colonizando cérvix y vagina, en el 60 al 90% de las mujeres estudiadas. Algunos investigadores proponen (31) la hipótesis que los niveles séricos de estrógenos y progesterona o ambos son un factor importante en la tasa de incidencia de U. urealyticum. McCormack (47) refiere que puede existir igual porcentaje de aislamiento en mujeres embarazadas y no embarazadas.

En el presente trabajo, se ha documentado la presencia de U. urealyticum en el tracto cervicovaginal en el 21.5% de las mujeres embarazadas estudiadas. La prevalencia de infección durante la gestación es variable y depende igualmente a lo mencionado a la población estudiada, de la edad y la actividad sexual con una pareja fija. Como se sabe durante la gestación existen modificaciones y cambios hormonales, bioquímicos locales y de la flora nativa, puede favorecer la multiplicación de gérmenes patógenos y/o oportunistas, lo que facilita la presencia de infección cervicovaginal, es posible como se ha mencionado a lo largo de este trabajo que las cepas

de ureaplasmas y especies de micoplasmas que afectan genitales, actúen como gérmenes oportunistas y que su acción patógena surja al combinarse con otros microorganismos, tal vez al sobrecrecer en un número significativo, les permite exhibir sus factores de daño. Por lo que la colonización por ureaplasmas durante el embarazo representa un riesgo potencial de infección.

En el campo de la Infectología Perinatal, la prematuridad del neonato susceptible a ser afectado por patógenos oportunistas de microflora materna, siendo esta una importante causa de morbi-mortalidad, por lo que se debe justificar el seguimiento bacteriológico de las mujeres embarazadas para valorar debidamente las condiciones de riesgo para el binomio madre-hijo.

Las tasas de colonización por Ureaplasma en este trabajo son más bajas que en las reportadas en los estudios de referencia, siendo una de las causas el tipo de población estudiada. Se considera que debería haber estudios sobre la presencia de U. urealyticum en población abierta, para tener conocimiento de su etiología en nuestro país ya que ciertos grupos de población puede tener alta prevalencia y es en mujeres colonizadas, las cuales se embarazan sin poder determinar el riesgo perinatal.

Los cultivos positivos a Ureaplasma fueron detectados más fácilmente en caldo, que sobre el agar. En general se detectó el crecimiento en caldo Urea en 18 a 24 horas y de 3 a 7 días sobre el agar B, esto dependiendo siempre del número de organismos presentes en la muestra.

Diversos estudios (2, 35, 37, 58, 86, 87) han demostrado que para mayor sensibilidad en el aislamiento de estos organismos es necesario la combinación de caldo y agar, realizando el primoaislamiento en caldo y posteriormente subcultivar sobre el agar E.

En cuanto a la metodología empleada, se comprobó, que son microorganismos difíciles de cultivar, pero la técnica desarrollada en el presente trabajo facilita el aislamiento e identificación. Además los medios de cultivo que se utilizaron son de preparación rápida y práctica para uso en el laboratorio.

## CONCLUSIONES

- La metodología empleada para el aislamiento e identificación de Ureaplasma urealyticum, desde el punto de vista microbiológico, es adecuado y tiene aplicación práctica a nivel de laboratorio.
- La frecuencia de aislamiento de U. urealyticum en el grupo de mujeres embarazadas fue de 21.5% y de 16.3% en el de no embarazadas.
- Ureaplasma urealyticum puede existir como flora normal en el tracto genital femenino, sin causar manifestaciones patológicas.
- Bajo ciertas condiciones U. urealyticum puede convertirse en un agente oportunista provocando infecciones con manifestaciones clínicas; encontrándose durante el embarazo factores que enriquecen el desarrollo de estos organismos.
- La repercusión de la colonización, infección o enfermedad en la embarazada, tiene un riesgo potencial no despreciable para el neonato.

## A P E N D I C E N° 1

### CALDO UREA

Para el aislamiento de Ureaplasma urealyticum.

Ingredientes para 100 ml.

- 1) Digestivo papaínico de harina de soya (Phytone Merck)  
1.3 g.
- 2) Cloruro de sodio (Laitz) 0.325 g
- 3) Rojo de Fenol 1% 0.5 ml
- 4) Agua bidestilada o desmineralizada 75 ml
- 5) Ajustar el pH a 5.5-5.6 con HCl 1N
- 6) Esterilizar en autoclave a 15 lbs por 15 min

Agregar en forma aséptica:

- 7) Suero de caballo estéril desgamaglobulinizado 15 ml
- 8) Dializado de levadura estéril 10 ml
- 9) Urea 50% 0.1 ml
- 10) Anfotericina B (stock 5000 u/ml) 0.1 ml
- 11) Penicilina G sódica (stock 100,000 u/ml) 1.0 ml
- 12) Kanamicina (20 u/ml) 0.5 ml

Verificar el pH final,  $pH_f$ : 6

## PREPARACION

En un matraz de 250 ml Erlen-Meyer adicionar los reactivos hasta el punto N° 4 en el orden indicado, ajustar a pH: 5.5-5.6 con HCl o NaOH 1N y esterilizar a 15 lb/15 min., dejar enfriar el medio hasta soportar lo caliente en el dorso de la mano e inmediatamente adicionar los reactivos desde el punto N° 7 y colocar 3 ml de caldo a cada tubo. Se someten los tubos con el caldo a prueba de esterilidad incubándolos en la estufa a 37°C durante 24 horas.

## AGAR E

Ingredientes para 100 ml:

- 1) Digestivo papaínico de harina de soya (Merck) 1.3 g
- 2) Cloruro de sodio (Laitz) 0.325 g
- 3) Rojo de Fenol 1% 0.5 ml
- 4) Agua bidestilada o desmineralizada 75 ml
- 5) Ajustar el pH con HCl 1N
- 6) Agar purificado exento de inhibidores (Merck) 1.5 g
- 7) Esterilizar en el autoclave 15 lbs 15 min

Agregar en forma aséptica:

- 8) Suero de caballo estéril desgamma globulinizado 15 ml
- 9) Dializado de levadura estéril 10 ml
- 10) Urea 50% 0.1 ml
- 11) Anfotericina B (sol. stock 5000  $\mu$ /ml) 0.1 ml
- 12) Penicilina G sódica (sol. stock 100,000 u/ml) 1.0 ml

13) Kanamicina (sol. stock 20  $\mu$ /ml) 0.5 ml

#### PREPARACION

En un matraz de 250 ml Erlen-Meyer adicionar los reactivos en el orden indicado, ajustar a un pH de 5.5-5.6 con HCl o NaOH 1N y esterilizar a 15 lb/15 min, dejar enfriar hasta soportar lo caliente en el dorso de la mano e inmediatamente adicionar los reactivos desde el punto N° 8 y colocar 3 ml de medio en las placas de Petri (35 x 12 mm) y dejar solidificar. Someter a prueba de esterilidad antes de utilizarse.

NOTA: En el caso de Caldo Urea utilizado para descartar formas-L, se omite el agregar los antibióticos.

#### CONCENTRACIONES FINALES

- Cloruro de sodio	0.05%
- Suero de caballo desammaglobulinizado	15.00%
- Dializado de levadura estéril	10.00%
- Rojo de Fenol	0.005%
- Urea	0.05%
- Penicilina G sódica	1000 U/ml
- Kanamicina	10 $\mu$ /ml
- Anfotericina B	5 $\mu$ /ml

#### MEDIO L

Ingredientes para 100 ml:

1) Sacarosa (Bioxon) 10 g

- 2) Digestivo papaínico de harina de soya (Merck) 2 g
- 3) Cloruro de sodio (Laitz) 0.5 g
- 4) Sulfato de manganeso heptahidratado (Merck) 0.33 g
- 5) Agar-agar purificado exento de inhibidores (Merck) 1.25 g
- 6) Agua desmineralizada o bidestilada 75 ml
- 7) Suero de caballo estéril desgammaglobulinizado 15 ml
- 8) Extracto de levadura o dializado de levadura 10 ml.

#### PREPARACION

En un matraz de 250 ml Erlen-Meyer adicionar los ingredientes hasta el punto N° 6 en el orden indicado y esterilizar a 15 lb durante 15 min dejar enfriar el medio hasta soporarlo caliente en el dorso de la mano e inmediatamente adicionar los reactivos desde el punto N° 8; vaciar en placas de Petri estériles, utilizando aproximadamente 20 ml para cada placa y dejar solidificar.

## A P E N D I C E N° 2

### PREPARACION DE REACTIVOS

#### DIALIZADO DE LEVADURA

- |                               |       |
|-------------------------------|-------|
| - Levadura seca de Fleischman | 908 g |
| - Agua destilada              | 2.5 l |

Se mezcla la levadura con agua caliente, se incorporan perfectamente, se autoclave a 15 lb por 10 min; se coloca en bolsas para dialisis, se dializa contra 2 l de agua des-mineralizada o bidestilada; el dializado se distribuye en viales estériles y se esteriliza en autoclave por 15 min a 15 lb de presión. Se almacena a -20°C, en estas condiciones se conserva estable durante 6 meses.

#### ROJO DE FENOL 1%

- |                         |         |
|-------------------------|---------|
| - Rojo de Fenol (SIGMA) | 10 g    |
| - NaOH 1N               | 30 ml   |
| - Agua destilada        | 1000 ml |

Depositar el rojo de fenol en un matraz aforado de 1000 ml agregar 570 ml de agua destilada y NaOH 1N. Agitar durante 2 horas a temperatura ambiente. Aforar con agua destilada y filtrar con papel Whatman N° 2.

## SOLUCIÓN DE UREA AL 50%

Urea (laitz)	50 g
Agua destilada	100 ml

Depositar la urea en un matraz aforado de 100 ml, aforar con agua destilada. Se esteriliza por filtración y se almacena en refrigeración.

## REACTIVO PARA LA PRUEBA RÁPIDA DE UREASA

- Urea (Laitz)	0.6 g
- Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ )	1.1 g
- Agua destilada	100 ml

Se integran los reactivos en los 100 ml de agua destilada se esteriliza por filtración, se almacena en pequeñas alícuotas a  $-20^\circ\text{C}$ .

## ANTIBIOTICOS PARA LA PREPARACION DE LOS MEDIOS

### ANFOTERICINA B (sol. stock 5000 $\mu\text{/ml}$ )

Disolver 50.6 mg de anfotericina B en 9 ml de dimetilsulfóxido (o dimetilformamida). Agitar hasta que se disuelva, se almacena en alícuotas en viales ámbar limpios y estériles.

### PENICILINA G SÓDICA (sol. stock 100,000 U/ml)

Disolver 59.88 mg de penicilina G sódica con 10 ml de agua destilada estéril y agitar suavemente hasta que se

disuelva, se esteriliza por filtración y alicuotar en viales estériles.

#### KANAMICINA (sol. stock 20 $\mu$ /ml)

Disolver 24.06 mg de Kanamicina con 9 ml de agua destilada estéril y agitar suavemente para disolverlo, esterilizar por filtración y distribuir en alicuotas en viales estériles.

Almacenar los antibióticos para su conservación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## B I B L I O G R A F I A

1. Anónimo: Pautas de tratamiento en Enfermedades Sexualmente Transmisibles. Suplemento del Informe Semanal de Morbilidad y Mortalidad. 34 (4) CDC, Atlanta, Georgia. 1985.
2. Brabin P.E.: Epidemiology of infection in pregnancy. Rev Infect Dis. 1985; 7:579-603.
3. Braun P., Klein J.O. y cols.: Methodologic investigations and prevalence of genital Mycoplasmas in pregnancy. J Infect Dis. 1970; 121:391-399.
4. Braun P., Lee Y.H., y cols.: Birth weight and genital Mycoplasmas in pregnancy. N Engl J Med. 1971; 284:167-171.
5. Brown M.B., Cassell G.H.: Measurement of antibodies to Ureaplasma urealyticum by an enzyme linked immunosorbent assay and detection of antibody responded in patients with nongonococcal urethritis. J Clin Microbiol. 1983; 17:288-295.
6. Busolo F., Zanchetta R.: Effect of Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum on hamster egg in vitro penetration by human spermatozoa. Fertil Steril. 1985; 43:110-114.
7. Bump R., Copeland E.: Urethral isolation of the genital Mycoplasmas and Chlamydia trachomatis in women with chronic urologic complaints. Am J Obstet Gynecol. 1985; 152:38-41.

8. Cassell G.H., Jouger J.B. y cols.: Microbiologic study of infertile women at ten time of diagnostic laparoscopy. N Engl J Med. 1983; 308:502-505.
9. Cassell G.H., Waites K.B. y cols.: Role of *Ureaplasma urealyticum* in amnionitis. Pediatr Infect Dis. 1986; 5 (suppl):S253-S257..
10. Cassell G.H.: Maternal and neonatal aspects. Pediatr Infect Dis. 1986; 5 (suppl):S341-S344.
11. Cedillo Ramírez M.: Complicaciones causadas por *Mycoplasma pneumoniae*. Infectología. 1986; 9:351-408.
12. Clyde W.A., Kenny G.E., Schachter J.: Laboratory diagnosis of *Chlamydial* and *Mycoplasmal* infections. CUMITECH N° 19. American Society for Microbiology. Washington, D. C. 1984.
13. Davis B.D.: Principles of Microbiology and Immunology. Harper International. 1968.
14. Deny W.F., Clyde W.A., Glezen P.W.: *M. pneumoniae* disease clinical spectrum. Pathophysiology Epidemiology and Control. J Infect Dis. 1971; 123:74-90.
15. Dowlic N.M., Heth R.W.: Métodos estadísticos aplicados.  $X^2$  de Pearson. Ed. Harla, S. A., Nueva York. 3ra. ed. 1973; 212-230.

16. Driscoll S.: Chorioamnionitis: Perinatal morbidity and mortality. *Pediatr Infect Dis.* 1986; 5 (suppl):S270-S272.
17. Embree J., Krause V.W., Embil J.A.: Placental infection with Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum: Clinical correlation. *Obstet Gynecol.* 1980; 56:475-481.
18. Eschenbach D.A., Buchanan T.M. y cols: Polymicrobial etiology of acute pelvic inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1975; 293:166-171.
19. Eschenback D.A.: Ureaplasma urealyticum as a cause of postpartum fever. *Pediatr Infect Dis.* 1986; 5 (suppl):S258-S261.
20. Fiacco, Miller y cols.: Comparison of media for isolation of Ureaplasma urealyticum and genital Mycoplasma species. *J Clin Microbiol.* 1984; 20:869-873.
21. Filloy L., Stamboulin D., Pacheco C.R.: El Mycoplasma en la uretritis no gonocócica (papel de los micoplasmas como agente etiológico). Participantes en el Symposium sobre infecciones del Aparato Genitourinario. Pfizer. 1976; 5-30.
22. Foulon Walter, Naessens y cols.: Chronic Ureaplasma associated with abruption placental. *Obstet Gynecol* 1986; 68:280-283.

23. Gallo D., Dupuis K.W., Schamidt J. and Kenny G.E.: Broadly reactive immunofluorescence test for measurement of immunoglobulin M and G antibodies to Ureaplasma urealyticum in infant and adult sera. J Clin Microbiol. 1983; 17:614-618.
24. Gilbert G., Garland S.M., Fairley K.F. y cols.: Bacteriuria due to Ureaplasma and other fastidious organisms during pregnancy. Prevalence and significance. Pediatr Infect Dis. 1986; 5 (suppl):S239-S243.
25. Gracett M.G., Eschenback D.A.: Possible role of Ureaplasma urealyticum in premature rupture of the fetal membranes. Pediatr Infect Dis. 1986; 5 (suppl):S253-S257.
26. Hardy P.H., Nell E.E., Spance M.R. y cols.: Prevalence of sex sexually transmitted disease agents among pregnant inner city adolescents and pregnancy outcome. Lancet. 1984; ii:333-335.
27. Harris R.F.: Genital Mycoplasmas and birth weight in primigravid women. Am J Obstet Gynecol. 1979; 133:201-207.
28. Harrison R.H.: Cervical colonization with Ureaplasma urealyticum and pregnancy outcome: prospective studies. Pediatr Infect Dis. 1986; 5 (suppl):S266-S269.
29. Harrison R.H., Russell A., y cols.: Cervical Chlamydia trachomatis and Mycoplasmas infections in pregnancy. J A M A. 1983; 250:1721-1727.

30. Hewish M.J., Birch D.F., Fairleg K.F.: Ureaplasma urealyticum serotypes urinary tract disease. *J Clin Microbiol.* 1986; 23:149-154.
31. Iwasaka T., Wada T., Klider A.: Hormonal status and Mycoplasma colonization in the female genital tract. *Obstet Ginecol.* 1986; 68:263-266.
32. Klein J.O.: Mycoplasma infections. En: Remington & Klein J.O. *Infectious Disease of the fetus and newborn infant.* Ed. WB Saunders (eds) 1983; 10:428-449.
33. Kreyszig E.: Pruebas para funciones de distribución (bondad de ajuste). En: *Estadística Matemática.* LIMUSA (ed), pag. 275.
34. Kundsín R.B., Shirley G., y cols.: Association of Ureaplasma urealyticum in the placenta with perinatal morbidity and mortality. *N Engl J Med.* 1984; 310:941-945.
35. Kundsín R.B., Parreno A., Poulin S.: Significance of appropriate techniques and media for isolation and identification of Ureaplasma urealyticum from clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 1978; 8:445-453.
36. Lee Y.H.: Microbiological investigation of Bartholin's gland abscesses and cysts. *Am J Obstet Gynecol.* 1977; 129:150-156.

37. Leland M.S., Lapworth M.A.: Comparative evaluation of media for isolation of Ureaplasma urealyticum and genital mycoplasma species. J Clin Microbiol. 1982; 16:709-714.
38. Lennette E.H., Balows A., Hausler W., Truant J.P.: Manual of Clinical Microbiology. 4a. ed. Washington, D. C. American Society for Microbiology. 1982.
39. L'Gamiz Matuz A.: Pruebas no paramétricas. En: Bioestadística. Editor Francisco Méndez Cervantes. Capítulo IX: 157.
40. Lin J.S.: Complement mediated killing of Ureaplasma urealyticum by antibodies directed against components of the growth medium. J Med Microbiol. 1983; 15:135-140.
41. Lin J.S., Kendrick M. y cols.: Serological typing of human genital T-Mycoplasmas by a Complement-dependent Mycoplasmacidal test. J Infect Dis. 1972; 126:658-663.
42. Lin J.S., Radnay K., Kendrick M.I. y cols.: Serologic studies of human genital mycoplasmas: Distribution of titers of mycoplasmacidal antibody to Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis in pregnant women. J Infect Dis. 1978; 137:266-273.
43. Masover G., Hayflick L.: The genera Mycoplasma, and Acholeplasma and associated organisms (Thermoplasmas and Anaeroplasma). En: Starr M., Hans T., Balows A. The Prokaryotes. Berlin, Heidelberg, New York. ed. Springer Verlag. 1985; 168:457-473.

44. McCormack W.M., Lee Y.H., Lin J.S. y cols.: Genital Mycoplasmas in postpartum fever. J Infect Dis. 1973; 127:193-196.
45. McCormack W.M., Taylor-Robinson D.: The genital Mycoplasmas. En: Sexually Transmitted Diseases. Holmes K., Mardh P.A., Sparling P.F. y Wiesner P.J. (ed) McGraw-Hill Book Co. 1984; 39:408-421.
46. McCormack W.M.: Mycoplasmas as agents of human disease. N Engl J Med. 1981; 304:80-89.
47. McCormack W.M., Plee y cols.: The genital Mycoplasmas. N Engl J Med. 1973; 288:78-89.
48. McCormack W.M., Priscilla C.A. y cols.: Sexual activity and vaginal colonization with genital Mycoplasmas. JAMA. 1972; 221:1375-1377.
49. Meseqwer M.A., Ferrer y cols.: Differential count of Ureaplasma urealyticum in male urologic patients. J Infect Dis. 1984; 149:657.
50. Moller J., Stenderup M.: Chlamydia, Mycoplasmas, Ureaplasmas and Yeast in the lower genital tract of female. Acta Obstet Gynecol Scand. 1985; 64:145-149.
51. Munday P.E., Furr P.M., Taylor-Robinson: The prevalence of Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis in cervix and canal women. J Infect . 1981; 3:253-257.

52. Naessens A., Foulon W. y cols.: Cervical and placental colonization with Ureaplasma urealyticum and fetal outcome. J Infect Dis. 1983; 148:333.
53. Naessens A., Lauwers S.: Modified Indirect Immunofluorescence test for serotyping large numbers of Ureaplasma urealyticum clinical isolates. J Clin Microbiol. 1987; 25:191-192.
54. Pfeiffer T.H., Forsyth P.S., Durfee M.A. y cols.: Nonspecific vaginitis: Role of Haemophilus vaginalis and treatment with metronidazole. N Engl J Med. 1978; 298:1429-1434.
55. Phillips L.E., Goodrick K.H., Turner R.M.: Isolation of Mycoplasma species and Ureaplasma urealyticum from obstetrical and gynecological patients by using commercially available medium formulation. J Clin Microbiol. 1986; 24:377-379.
56. Quinn M.A. y cols: Intrauterine infection with Ureaplasma urealyticum as cause of fetal neonatal pneumonia. Pediatr Infect Dis. 1985; 4:538-543.
57. Razin S.: Molecular Biology and Genetics of Mycoplasmas (Mollicutes). Microbiol Rev. 1985; 49:418-455.
58. Robertson J.H., Chen M.H.: Effects of manganese on the growth and morphology of Ureaplasma urealyticum. J Clin Microbiol. 1984; 19:857-864.

59. Robertson J.A.: Potential virulence factors of Ureaplasma urealyticum. Pediatr Inf Dis. 1986; 5 (suppl):S322-S324.
60. Robertson J.A., Honore L.H., y cols.: Serotypes of Ureaplasma urealyticum in spontaneous abortion. Pediatr Infect Dis. 1986; 5 (suppl):S273-S275.
61. Rudd P.T., Waites K.B., Duffy L.B.: Ureaplasma urealyticum and the neonatal period and infancy. Pediatr Infect Dis. 1986; 5 (suppl):S288-S291.
62. Savige J.A. y cols.: Bacteriuria due to Ureaplasma urealyticum and Gardnerella vaginalis in women with preclamsia. J Infect Dis. 1983; 148:605.
63. Sharon A., Poulin R., Kundsinn R.B. y cols.: Survival of Ureaplasma urealyticum on different kinds of swabs. J Clin Microbiol. 1979; 10:601.
64. Shepard M.C.: Nongonococcal urethritis associated with human strains of T- Mycoplasma. J A M A. 1970; 211:1335-1340.
65. Shepard M., Lucenford C.D.: Serological typing of Ureaplasma urealyticum isolates from urethritis patients by an agar growth inhibition method. J Clin Microbiol. 1978; 8:566-574.
66. Shepard M.C., Lucenford C.D.: Differential agar medium (A7) for identification of Ureaplasma urealyticum (human T-Mycoplasmas) in primary cultures of clinical material. J Clin Microbiol. 1976; 3:613-625.

67. Shepard M.C.: Ureaplasma urealyticum: History and progress. *Pediatr Infect Dis.* 1986; 5 (suppl):S223-S231.
68. Shurin P.A., Alpert S., Roaner B.: Chorioamnionitis and colonization of the newborn infant with genital mycoplasmas. *N Engl J Med.* 1975; 293:5-7.
69. Siveet R.L.: Colonization of endometrium and fallopian tubes with Ureaplasma urealyticum. *Pediatr Infect Dis.* 1986; 5 (suppl):S239-S243.
70. Stemke G.W., Robertson J.A.: Modified colony indirect epifluorescence test for serotyping Ureaplasma urealyticum and adaptation to detect common antigenic specificity. *J Clin Microbiol.* 1981; 14:582-584.
71. Stuckery M., Quinn P.A., Gilfand E.W.: Identification of Ureaplasma urealyticum (T-strain Mycoplasma) in a patient with polyarthritis. *Lancet.* 1978; 2:917-920.
72. Suchet H., Loffredo V.: Chlamydiae and Mycoplasma genital infection in salpingitis and tubal sterility. *Lancet.* 1980; 1:539-547.
73. Takebe S., Numata A., y cols.: Stone formation by Ureaplasma urealyticum in human urine and its prevention by urease inhibitors. *J Clin Microbiol.* 1984; 20:869-873.
74. Tarr P.I.: Comparison of methods for isolation of genital Mycoplasmas from men. *J Infect Dis.* 1976; 133:419-421.

75. Taylor-Robinson D., McCormack W.M.: Mycoplasmas in human genitourinary infections. En: Tully J.G. y Whit Comb R.F. (ed.) The Mycoplasmas. Academic Press, Inc. 1979; 2:307-366.
76. Taylor-Robinson D.: Recovery of Mycoplasmas from the genitourinary tract. En: Tully J.G. y Razin S. (ed.) Methods in Mycoplasmaology. Academic Press Inc New York. 1983; 2.
77. Taylor-Robinson D., McCormack W.M.: The genital Mycoplasmas N Engl J Med. 1980; 302:1003-1010 y 1063-1067.
78. Taylor-Robinson D., Furr P.M., Webster F. y cols.: Ureaplasma urealyticum in the immunocompromised host. Pediatr Infect Dis. 1986; 5 (suppl):236-237.
79. Taylor-Robinson D.: The male reservoir of Ureaplasma urealyticum. Pediatr Infect Dis. 1986; 5 (suppl):S234-S235.
80. Thomsen A.C.: The occurrence of Mycoplasmas in the urinary tracts of patients with acute pyelonephritis. J Clin Microbiol. 1978; 8:84-88.
81. Thomsen A.C.: The occurrence of Mycoplasmas in the urinary tracts of patients with chronic pyelonephritis. Acta Pathol Microbiol Scand. 1975; 83:10-15.
82. Thomsen A.C.: Mycoplasmas in human pyelonephritis: Demonstration of antibodies in serum and urine. J Clin Microbiol. 1978; 8:197-202.

83. Tully J.G., Taylor R.: Taxonomy and host distribution of Ureaplasma. Pediatr Infect Dis. 1986; 5 (suppl):S322-S324.
84. Vogler L.B., Woites W.B., y cols: Ureaplasma urealyticum polyarthritits in agammaglobulinemia. Pediatr Infect Dis. 1985; 4:687-691.
85. Wallace R.J.: Isolation Mycoplasma hominis from blood cultures in patients with post partum. Obstet Gynecol. 1978; 51:181-184.
86. Woodr J, Peterson E.M., y cols: Evaluation of Micotrim-GU for isolation of Mycoplasmas species and Ureaplasma urealyticum. J Clin Microbiol. 1985; 22:789-792.
87. Yasko D.M., Balston E., y cols: Evaluation of PPL0, A7B, and NYC agar media for the isolation or Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma species from the genital tract. J Clin Microbiol. 1984; 19:73-76.