



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO.**

F.E.S. ZARAGOZA

23
2 ej.

Instituto de la Universidad Autónoma de México, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química Farmacéutica, F.E.S. Zaragoza, en colaboración con el Centro de Bacterias.

Tesis que presenta: **González Becerra Laura Odette** para obtener el título de
Químico Farmacéutico Biólogo

Marzo de 1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

El presente trabajo fue apoyado por la Fundación Mexicana para la Salud (FUNSALUD) y realizado en el laboratorio de Bacteriología de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

A Dios por haberme permitido terminar...

A mis padres: *Lucy y Polo* por su constante apoyo moral y económico...

A mis hermanos *Adolfo, Mary y Jesi*...

A *Alfredo*, por impulsarme a seguir adelante y por su ayuda ...

Y a mis abuelos *Adolfo, Mary y Joaquín*...

Agradezco al M. en C. Felipe González por su apoyo, sus conocimientos, y por su asesoramiento en la realización de este trabajo.

Al Q.F.B. Roberto González M. por su asesoramiento.

A la Dra. Martha L., a la Q.F.B. Lourdes V., y al Q.F.B. Antonino S. que amablemente aceptaron participar como sinodales en la presente tesis.

Y al personal del Centro Médico Nacional Siglo XXI por su amabilidad y su constante ayuda, en especial al Dr. Javier Torres, a la M. en C. Margarita Camorlinga, a la Q.F.B. Silvia González y a la Dra Ruth Parra, a todos ...

Gracias

**Incidencia de la Enfermedad Respiratoria en Recién Nacidos
Pretérmino Causada por *Ureaplasma urealyticum* y su
Diagnóstico mediante PCR Comparada con el Cultivo
Bacteriano.**

INDICE

Glosario de términos y abreviaturas	5
Resumen	9
Introducción	10
Fundamentación teórica	
Historia	11
Nomenclatura	13
Taxonomía	13
Descripción	13
Condiciones de crecimiento	15
Biología molecular	16
Mecanismos de patogenicidad	16
Aspectos celulares inmunes	20
Respuesta inmune	20
Epidemiología	21
Infecciones clínicas	21
Diagnóstico	25
Tratamiento	30
Planteamiento del problema	31
Objetivos	31
Hipótesis	31
Diseño de la investigación	32
Resultados y análisis de resultados	44
Discusión de resultados	60
Conclusiones	65
Anexo	66
Bibliografía	77

GLOSARIO.

Ateteo nasal: Movimientos de las alas de la nariz en la disnea

Amortiguador: solución que previene el cambio que se producirá en la concentración de iones de hidrógeno, añadiendo álcalis o ácidos

Anticuerpo Sustancia específica presente en la sangre y otros fluidos orgánicos (globulinas) que aparecen tras la inoculación de elementos extraños (antígeno) sobre los que actúa específicamente aglutinándolos (aglutinina), destruyendolos (lisina), neutralizándolos (antitoxina), o precipitándolos (precipitinas)

Anticuerpos monoclonales: Proteína producida a consecuencia de la introducción de un antígeno y que tiene la propiedad de combinarse con un antígeno que proviene de una sola clona y estimula su producción.

Antígeno: Sustancia que al introducirse en el organismo provoca la formación de anticuerpos.

Bacteriostática: Solución que mantiene al microorganismo viable pero no permite su crecimiento.

Biovar o Biotipo: Subgrupo de la bacteria basado en el serovar que se diferencia mediante pruebas bioquímicas y fisiológicas especializadas.

bp: Pares de bases.

Cianosis: Coloración azul o livida de la piel y mucosas a causa de oxigenación insuficiente de la sangre.

CLD de la prematuraz: Enfermedad pulmonar crónica de la prematuraz

Codón. Triplete de tres bases en una molécula de DNA o RNA , que codifica un aminoácido específico.

Colonización Presencia de un microorganismo no patógeno que se está reproduciendo, si se reproduce mucho puede producir infección aunque sea no patógeno

Cromosoma: Cuerpos diminutos en forma de asa en que se divide la cromatina nuclear en la mitosis. Cada uno de ellos se divide longitudinalmente originando dos asas gemelas iguales

dNTPs: Mezcla de nucleótidos (dATP, dTTP, dCTP y dGTP)

Electroforesis: Separación de moléculas por medio de un campo eléctrico

Endotoxinas: Liposacáridos que derivan de las paredes celulares de microorganismos Gram negativos y tienen efectos tóxicos o pirógenos cuando se inyectan *in vivo*

Enfermedad: Alteración o desviación del estado fisiológico en una o varias partes del cuerpo. Es un desequilibrio entre el microorganismo, el medio ambiente y el huésped

Enzimas: Complejos orgánicos que catalizan las reacciones bioquímicas

Epitopo: La forma más simple de determinante antigénico presente en una molécula compleja, que se combina con el anticuerpo o receptor de la célula T

Exotoxinas: Toxinas difusibles por ciertos microorganismos Gram positivos y Gram negativos

Fab: Fragmento fijador del antígeno desprendido por fijación enzimática de una molécula de IgG con papaina

Fagocitosis: Englobamiento de bacterias u otras partículas por los leucocitos

Fc: Porción cristizable obtenida por la digestión con papaina de moléculas de IgG que no contiene las mitades carboxilo terminal no posee actividad fijadora de antígeno. Para receptor es una sustancia proteica presente en la membrana de varias subclases de linfocitos y que actúa como receptor para el fragmento Fc de inmunoglobulinas

Gen: Unidad de material hereditario que ocupa un locus definido en el alelo

Hidrofílico: Compuesto soluble en agua. Los grupos hidrofílicos del exterior de la proteínas y membranas celulares se fijan al agua

Hidrofóbico: Compuesto insoluble en agua. Los grupos hidrofóbicos de proteínas y membranas son empujados al interior de las moléculas, lejos del agua

Hipogammaglobulinemia: Disminución de las proteínas séricas con movilidad gamma en la electroforesis que constituyen la porción de inmunoglobulinas y anticuerpos

Huésped inmunocomprometido: Cuando no existe protección contra alguna enfermedad

Humoral: Que atañe a moléculas solubles en líquidos corporales, en particular anticuerpo y complemento

IgA: Clase de inmunoglobulina que predomina en secreciones. **Secretora:** Dímero de moléculas colgA con un coeficiente de sedimentación de 11S, unido por cadena J y agregado a componente secretor

IgG: Clase de inmunoglobulina que predomina en el suero humano.

IgM: Inmunoglobulina pentamérica que constituye aproximadamente el 10% del total de inmunoglobulinas séricas humanas

Incidencia: Número de casos nuevos que presentan la enfermedad en un período de tiempo específico

Infección: Un microorganismo patógeno se encuentra en un lugar que no debiera, pero sin afectar al individuo.

Infección oportunista: Capacidad del microorganismo de escasa virulencia para causar enfermedad durante alteraciones de la inmunidad

Inmunoglobulina: Glucoproteína que funciona como anticuerpo. Todos los anticuerpos son inmunoglobulinas pero no se sabe si todas las inmunoglobulinas funcionan como anticuerpos. En el hombre hay cinco clases de IgA, IgG, IgM, IgD e IgE.

Inoculación: Introducción de una sustancia o germen a un huésped de manera voluntaria o accidental, para producir la enfermedad.

Insuficiencia respiratoria: Oclusión deficiente de las válvulas sigmoideas pulmonares, en los niños recién nacidos se caracteriza por los siguientes signos: aleteo nasal, taquipnea en los primeros 3 a 6 horas de vida extrauterina, cianosis, tirios intercostales, rechazo al alimento y decaimiento.

Intubación: Introducción de un tubo en una cavidad.

MB (Antígeno Multibandeado): Antígeno que se encuentra en la superficie externa de los 14 serotipos de *U. urealyticum*

Neumonía: Inflamación del tejido pulmonar. **Atípica:** que no responde a un tratamiento específico. Crónica: esclerosis pulmonar de evolución lenta que termina en la transformación fibrosa de la parte enferma.

NGU: Uretritis no gonocócica.

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida.

PCR: técnica para amplificar segmentos de DNA o RNA genéticos, de composición conocida, con cebadores

Primer: secuencia de oligonucleótidos que funcionan como iniciadores o cebadores en la síntesis del DNA

Procariota: Organismo con núcleo verdadero que contiene un solo cromosoma lineal

Reacción cruzada: Interacción de un anticuerpo con un antígeno diferente de la inducida para su formación

Recién nacido de término: Niños cuyo periodo de gestación es completo (9 meses)

Recién nacido pretérmino: En este estudio se consideran pretérmino, aquellos niños cuya edad de gestación varía de un rango de 23 a 34 semanas

Septicemia: Infección generalizada caracterizada por la proliferación de bacterias en el torrente sanguíneo y lesiones inflamatorias en otros órganos o tejidos

Serología: De manera literal es el estudio del suero. Se refiere a la determinación de anticuerpos a microorganismos infecciosos importantes en medicina clínica

Serovar o Serotipo: Subgrupo de la bacteria basado en la presencia de antígenos los cuales se identifican por medio de serología

Signos: Fenómeno o carácter objetivo que se presenta en una enfermedad

Síntomas: Manifestación de una alteración orgánica o funcional apreciable por el enfermo

Southern: Métodos para determinar segmentos de DNA que han sido digeridos con enzimas de restricción y sometidos a electroforesis de acuerdo a su tamaño. A continuación los segmentos son recogidos en una membrana de nitrocelulosa y se hacen reaccionar con probadores radiomarcados o con enzimas agregadas.

Taquipnea: Respiración acelerada superficial.

Templado: Contiene el DNA extraído a partir de muestras o de un control

Tiros intercostales: Hundimiento entre las costillas

RESUMEN

La finalidad de este estudio fue evaluar la incidencia de *Ureaplasma urealyticum* en la enfermedad respiratoria de niños recién nacidos pretérmino con enfermedad respiratoria. Se tomaron 90 muestras de aspirado traqueal, en niños con las siguientes características: edad gestacional de 23 a 34 semanas, vida extrauterina menor o igual con 7 días, tiempo de intubación no mayor de 12 horas y peso mayor o igual a 550g. Las muestras fueron tomadas en los hospitales de gineco-obstetricia del Centro Médico "La Raza" y "Tlatelolco". Todas fueron evaluadas por medio de cultivo en medio 10B y agar A8 resultando 10 muestras positivas por este método (11.1%), posteriormente se diagnosticó la presencia de este microorganismo por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando como primers el gene del Antígeno Multibandeado (MB). Con este método se lograron identificar inicialmente 13 muestras positivas (14.4%), después de la purificación se identificaron dos muestras que inicialmente habían sido negativas por PCR y positivas por cultivo, por lo tanto la incidencia por el método de diagnóstico por PCR fue del 16.66% (15 muestras positivas totales). Posteriormente se comparó el método de PCR contra el cultivo bacteriano y mostró una sensibilidad del 100%, especificidad de 93.75%, valor predictivo positivo de 66.66%, valor predictivo negativo de 100% y una exactitud de 94.4%, por lo cual el método puede usarse como alternativo para el diagnóstico de *U. urealyticum*. El bajo peso al nacer (menor de 1555g) y la edad extrauterina menor (sobre todo en el 1er día de edad) son las características más importantes para que pueda presentarse la enfermedad causada por *Ureaplasma urealyticum* en el tracto respiratorio del niño.

INTRODUCCION.

Los Mycoplasmas son los microorganismos más pequeños de vida libre con capacidad de transmisión lo que los hace diferentes de los virus. No presentan pared celular como todos los que pertenecen a la familia Mycoplasmataceae, esta característica los hace diferentes de las bacterias.^(1, 20)

Los Mycoplasmas no hidrolizan la urea, excepto el género *Ureaplasma*, lo que los difiere del resto de los Mycoplasmas. *Ureaplasma urealyticum* se presenta en el 40 al 80% de las mujeres con actividad sexual por lo que se considera como un comensal en el tracto genital inferior de la mujer, se ha visto que algunas mujeres colonizadas con este microorganismo son propensas a tener niños con bajo peso o que nazcan prematuramente, es capaz de producir corioamnioitis, la transmisión vertical ocurre y puede causar neumonía, meningitis y displasia broncopulmonar en niños recién nacidos, sobre todo en los prematuros, además, se ha asociado con uretritis no gonocócica y artritis crónica en pacientes hipogamaglobulinémicos o inmunocomprometidos.^(3, 7, 12, 27, 34)

Actualmente el mejor diagnóstico es por cultivo, sin embargo este tarda de 3 a 5 días como mínimo y hasta 15 días para poder decir que una muestra es realmente negativa, por lo que se requiere de un método de diagnóstico rápido sobre todo para las infecciones producidas en niños.⁽¹⁾

FUNDAMENTACION TEORICA

• HISTORIA

La historia de *Ureaplasma urealyticum* comenzó en septiembre de 1950, Shepard observa por primera vez las colonias a las cuales denominó *Cepa T de Mycoplasma*, les dió ese nombre porque son parecidas a *Mycoplasma* y la letra *T* proviene de "Tiny" que significa pequeña (colonias pequeñas de *Mycoplasma*) *Ureaplasma urealyticum* fue descubierto en un paciente con uretritis no gonocócica (NGU) ^(1,20) El 22 de septiembre de 1950 se observa la primer colonia por medio de microscopio con un poder de 100X y embebida entre el agar Durante el primer año después de su descubrimiento, solo se midieron las dimensiones y se observa la variante morfológica

La Dra. Justina Hill en 1954 discutió sobre la relación de los organismos parecidos a aquellos que causan pleuroneumonía (PPLO) en las enfermedades transmitidas sexualmente como uretritis inespecífica, sin que se conociera la causa de la infección o como se transmitía y *Ureaplasma* se encontraba entre estos microorganismos ^(1, 2, 20)

Sin embargo, era muy difícil la observación de estos microorganismos, lo cual radicaba en que aparte de ser colonias pequeñas daban la apariencia de ser artefactos y se teñían débilmente con tinción de Gram

El 16 de septiembre de 1954 se incluye la primera descripción por escrito de *Ureaplasma* en el simposium sobre (NGU) dentro de la Organización Mundial de la Salud (OMS) ⁽¹⁾

Denis Ford en 1962 confirma su existencia en un área geográfica diferente (Canadá) y observa que el microorganismo crece mejor en medio líquido teniendo títulos altos a las 16 hrs de incubación y estos raramente excedían de 10⁶ UFC (Unidades formadoras de colonias) ⁽¹⁾

En 1965 Shepard y Lucenford encontraron que la fermentación de la dextrosa producida por *Streptococcus sp* optimiza el cultivo de *Ureaplasma* a un pH entre 5.5 a 6.5.

En 1963 se demuestra la hidrólisis de la urea como resultado de la acción de la ureasa producida por este microorganismo. Este hallazgo es de gran importancia para el entendimiento bioquímico y requerimientos nutricionales, así como, para facilitar su detección e identificación. En 1974 en una cooperativa de trabajo se discutió que el organismo debería pertenecer a un nuevo género y especie al que se le denominó *Ureaplasma urealyticum*. ⁽²⁰⁾ En 1977 con base en esta propiedad fue propuesto en la familia *Mycoplasmataceae*. ^(1, 20)

El primer caldo con prueba de color fue el medio U9 usado en 1970 este se suplementa con suero de caballo al 5% y rojo de fenol como indicador. En 1976 se incorpora L-Cisteína al 0.01% y se le nombra caldo U9B. En 1978 se desarrolló el caldo 10 B en el cual el cambio de color indica la presencia de un microorganismo productor de ureasa. Este medio también tiene como indicador rojo de fenol y presenta la ventaja de conservar a las cepas viables por largos periodos de tiempo a una temperatura de -60°C a -70°C.⁽¹⁾

En 1976 se desarrolla el agar diferencial A7 con base a la misma reacción de la ureasa.⁽¹⁾ En 1983 se publica la fórmula del agar A8 en donde se usa como catión indicador al cloruro de calcio divalente a una concentración de 1 mM. Evidencias recientes sugieren que niveles altos de CaCl₂ son beneficios (2.0 a 3.0 mM).^{(1), (9)}

• **NOMENCLATURA:**

A *Ureaplasma urealyticum* se le denomina también como:

- a) *Cepa T de Mycoplasma,*
- b) *Cepa T,*
- c) *T.Mycoplasma y*
- d) *Ureuplasma.*^(1,26)

• **TAXONOMIA:**

Pertenece a la clase *Mollicutes*, que se deriva de la especie ancestral *Clostridia* por delección genética. Al orden *Mycoplasmatales*, a la familia *Mycoplasmataceae*, género *Ureaplasma* y como única especie patógena en humanos *U. urealyticum*. Esta especie se ha subdividido en 2 biotipos, con base en la inhibición de crecimiento en caldo con manganeso a una concentración 1.0 mM^(2, 15, 19, 20) El biotipo 1 incluye los serotipos 1, 3, 6 y 14 en los cuales la inhibición en caldo es temporal. El biotipo 2 incluye los serotipos 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 en los cuales la inhibición es permanente^(4, 21) Esta es solo una característica fenotípica, pero también se pueden diferenciar por hibridación DNA-DNA, Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP), electroforesis en gel en 1 y 2 dimensiones, tamaño genómico y amplificación por PCR de genes específicos.⁽³⁴⁾

• **DESCRIPCION:**

Cuadro 1 "Comparación de los Mycoplasmas con bacterias y virus"

Características	Mycoplasma	Bacteria	Virus
Diámetro (µm)	0.3	1 a 2	<0.5
Falta de pared	si	no	si
Propagación en medios libres de células	si	si	no
Requiere esteril y proteínas activa	si	no	no
Metabolismo energético intrínseca	si	si	no
Especificidad del hospedador	si	no	si
Crecimiento inhibido por Ab específico	si	no	si
Resistencia a antibiótico que actúa sobre pared	si	no	si
Resistencia a antibiótico que inhibe metabolismo	no	no	si

Fuente: Referencia 19

Son los microorganismos más pequeños de vida libre con capacidad de transmisión (a veces más pequeños que los virus) capaces de invadir al hombre, carecen de pared celular, es decir, están rodeados por una membrana celular (7.5 a 10 nm) por lo tanto, no son susceptibles a antibióticos dirigidos contra pared (como los β -lactámicos) y la tinción con Gram es difícil⁽²⁾. Tiene una capa extramembranosa de 20 a 30 nm observada con la tinción con rojo de ruenio, presenta estructuras morfológicamente similares a un pili corto vista rodeando la superficie de la membrana. En la capa extramembranosa se encontró que tenía residuos semejantes a glucosil y la purificación de diversas cepas de *Ureaplasma* se reporta que contienen entre 1 y 7 % de carbohidratos, los azúcares son manosa, galactosa y glucosa. Estas hexosas se encuentran en la membrana en forma de lipoglicanos. La composición ácida de la membrana presenta diferentes proporciones de ácidos libres ácido fosfatídico, ácido fosfatidietanolamina y un lípido polar diaminoalcohol. La membrana también contiene colesterol y las células son susceptibles a la lisis por digestión⁽²⁰⁾.

Tienen un pequeño genoma (4.1–4.8 x 10⁸ Daltons), por lo cual requieren de precursores de ácidos nucleicos preformados (extracto de levadura) y enriquecer el medio con colesterol y urea (tomados del suero), también requiere esterol.

Fisiología: *Ureaplasma* se distingue por ser el único género de los *Mycoplasmas* que hidroliza la urea, no metaboliza la glucosa ni arginina; no tiene actividad lactato deshidrogenasa, es catalasa negativo, fosfatasa positivo, no reduce el tetrazolium; tiene actividad proteolítica, es RNAasa y DNAasa positivo, hemolisa eritrocitos de diversas especies animales, esta hemólisis es soluble y es probablemente peróxido, aunque no siempre ha sido posible la inhibición de hemólisis con catalasa, es sensible a eritromicina y tetraciclina y resistente a lincomicina^(2, 21). No se ha detectado algún dependiente de oxígeno en la actividad de NADH oxidasa, parece carecer de los mecanismos convencionales para generar ATP (síntesis de energía), esto propone que la generación de ATP es el resultado de la hidrólisis de la urea que genera un potencial eléctrico debido a la producción de NH₄⁺ a través de la membrana. Otros sugieren que el posible camino para la producción de ATP es la hidrólisis del piruvato^(19, 20).

Los *Ureaplasmas* son extremadamente sensibles a las condiciones ambientales adversas, especialmente a la resquead, cambios osmóticos y metabolitos tóxicos. Debe tenerse especial cuidado para asegurarse de que el espécimen no este sujeto a estas fluctuaciones ambientales⁽³⁾.

Composición de la membrana: Contiene proteínas y lípidos como cualquier membrana biológica. Las proteínas comprenden aproximadamente las dos terceras partes de las

membranas de los *Mycoplasmas* y el balance es únicamente con lípidos. Los carbohidratos se asocian más con membranas de *Mycoplasma*.^(1), 20)

En el caso de *Ureaplasma* Robertson y Smook reportaron una extramembrana de carbohidrato, una membrana delgada de polianiones se demostró por la técnica de rojo de rutenio y se encontró que tenía residuos de glucosil. Las membranas de los *Ureaplasmas* presentan cualidades únicas de los *Mollicutes* por ejemplo, la composición de ácido fosfatídico, fosfatídil etanol amina, lípidos diaminohidroxipolar y actividad ATPasa

Biología celular: La estructura y composición química de las células de *Ureaplasma* después de cultivar de 18 a 24 hrs son similares a otros Micoplasmas. La morfología microscópica de *Ureaplasma urealyticum* se describe como formas pleomórficas básicamente como esferas pequeñas de 330 nm de diámetro (el tamaño varía desde 100 a 850 nm.), o como elementos bacilares cortos asociados con células epiteliales infectadas en exudados clínicos, presentan filamentos ramificados. Estas características dependen de la composición del medio, pH, método de fijación y método de examinación. Por el método de hematoxilina - Giemsa se observan como elementos ovoides o redondos, simples, en pares, triadas, tetradas, cadenas cortas de 3 a 5 elementos y varias piezas agregadas. En Gram se caracterizan por ser negativos. En el método de fijación es importante preservar la morfología.⁽¹⁾

Se multiplican por proceso de gemación simple y dos o más genomas pueden aparecer simultáneamente. El proceso de gemación múltiple parece explicar la ramificación, modo polidireccional el cual resulta en el crecimiento flocular o agregados que provocan la variación de tamaños cultivado, en caldo y agar. La replicación por fusión binaria también puede existir.^(1), 20)

En Agar las colonias pueden tener las siguientes características:

Colonias pequeñas de 15 a 30 μm , con bordes irregulares, morfología como cabeza de coliflor (multilobuladas) embebidas en el medio o bien como huevo frito sobre agar que se encuentra a un pH entre 6.0 \pm 0.5. Estas colonias se observan con el microscopio estereoscópico.^(10), 15)

- **CONDICIONES DE CRECIMIENTO:**

La atmósfera preferida de *Ureaplasma urealyticum* depende del medio empleado, por ejemplo: sobre agares cuyo pH es de 6.0 requiere de una mezcla de aire, nitrógeno y CO₂ entre 5-15%. También presenta buen crecimiento anaerobio básicamente en una mezcla de H₂ + CO₂. Se pueden usar niveles altos de CO₂ teniendo precaución. La adición de

otros suplementos como urea, y amortiguadores son factores críticos determinantes para el nivel de CO₂ requerido⁽¹¹⁾. Una concentración aumentada de CO₂ (20% o más) favorece el desarrollo de las colonias y pueden asumir la morfología de huevo frito. En agar A7 se recomienda una baja concentración de CO₂, pues las concentraciones aumentadas son inhibitorias^(10, 11). Su crecimiento es pobre aerobicamente.

La temperatura óptima de multiplicación y crecimiento es de 35°C a 37°C. Se ha reportado⁽¹⁾ que crecen bien a 40°C pero su multiplicación se ve afectada. No presenta crecimiento de 42°C. a 45°C., y su multiplicación se ve disminuida a 27°C y a 30°C. A 20°C., algunas cepas se encuentran viables y crecen a esta temperatura. *Ureaplasma urealyticum* es susceptible a inactivación por calor a temperaturas de 56°C en un tiempo entre 2.5 minutos a 30 minutos, el tiempo depende de los serovares^(10, 11).

En el cultivo en caldo a 4°C es viable por 16 días y a - 20°C por 90 días. Para la conservación por un año o más necesita de un almacenamiento de - 60°C a - 85°C^(10, 11).

Los *Mycoplasmas* clásicos crecen a un pH que varía de 7.6 a 8.0, pero *Ureaplasma urealyticum* prefiere una reacción ácida a un pH de 6.0 ± 0.5 en medio líquido o sólido^(10, 11).

- **BIOLOGIA MOLECULAR:**

Son básicamente mononucleadas con un genoma simple^(1,20).

El contenido de G-C en el DNA de *Ureaplasma* varía de un intervalo de 26.9 a 28 mol %. Este rango sugiere homología genética entre varias cepas y serovares. El tamaño del genoma de los cuatro serovares del biovar 1 es aproximadamente de 760 Kb, el tamaño del biovar 2 tiene un rango entre 880 a 1140 Kb⁽²⁰⁾.

- **MECANISMOS DE PATOGENECIDAD.**

La vaginosis bacteriana (VB) está asociada con el nacimiento prematuro, sin embargo, la relación precisa entre la VB, *U. urealyticum* y el nacimiento prematuro no se conoce. Se ha postulado que las concentraciones aumentadas de organismos que causan VB pueden aumentar la síntesis de fosfolipasa A₂ y la producción de prostaglandinas que llevan a la ruptura prematura de membranas. La infección con bacteroides en el tracto genital inferior puede provocar la síntesis de proteasas que debilitan la membrana y la rompen, ocasionando invasión de otros organismos. Posiblemente *Ureaplasma* invade

membranas fetales intactas solo porque estos organismos se encuentran en gran número.⁽¹³⁾

Adherencia:

El primer paso en la patogénesis de *Ureaplasma urealyticum* es el ataque a eritrocitos y otras células eucariotas, la hemadsorción se demostró en eritrocitos de cobayo por el serovar 3, sin embargo, se ha demostrado que algunas cepas de otros *Ureaplasmas* atacan a eritrocitos en suspensión. Cuando se probaron seis diferentes cepas de *Ureaplasma urealyticum* de origen humano en células HeLa, algunas de ellas fueron adsorbidas más vigorosamente que otras; este mecanismo también se observó en otras líneas celulares.⁽²⁰⁾ Se han observado también en células de monoestearato.⁽²⁰⁾

Producción de toxina

Parece ser que existe elaboración de productos tóxicos por algunas o todas las cepas de *U. urealyticum*, aunque esto es una controversia y no se conoce su identidad, hace suponer que la acumulación de toxinas presentes suspenden el crecimiento del microorganismo de manera brusca. El producto tóxico es catalasa resistente, termoestable y dializable.⁽²⁰⁾

La hidrólisis de urea por *Ureaplasma* produce amonio y provoca un cambio de pH el cual es tóxico para las células y tejidos tanto *in vivo* como *in vitro*. Al parecer el amonio produce pequeñas áreas de intoxicación sobre las células y la mucosa, debido a la acumulación del ion amonio que puede actuar como factor tóxico y causar patogénesis inducida por *Ureaplasma*. Este efecto citopático se ha observado en cultivos celulares, y posiblemente también causa aberraciones cromosómicas esto se observa en cultivos de linfocitos humanos.⁽²⁰⁾

Producción de peróxido

Como se mencionó antes probablemente el peróxido es el posible responsable de la lisis de los eritrocitos.⁽²⁰⁾

Actividad proteasa IgA:

Es un importante factor de virulencia de algunos patógenos de las mucosas, que se ha demostrado en *Ureaplasma urealyticum* con especificidad para IgA (I).⁽²⁰⁾

Inmunidad celular.

La habilidad de *Ureaplasma urealyticum* para estimular la linfocitosis en el proceso inflamatorio no se conoce ampliamente, pero se sugiere que tiene un papel en la etiología de artritis reactiva, en donde *Ureaplasma* de forma espontánea se une al neutrófilo y es fagocitado pero no muere en presencia de complemento y en ausencia de anticuerpos lo cual es común en pacientes con hipogammaglobulinemia, por lo tanto, los neutrófilos tienen un papel defensivo muy pequeño y más bien ayudan a la diseminación del microorganismo y por consiguiente a diseminar la infección.⁽²⁹⁾

Antígeno multibandeado (MIB)

Existen otros antígenos de *Ureaplasma urealyticum*, como los antígenos de superficie de proteína, los cuales son importantes en la respuesta inmune y patogénesis de la enfermedad, pero no se han definido.

Un antígeno predominantemente reconocido durante la infección humana causada por *U. urealyticum* es el antígeno Multibandeado. El nombre del antígeno multibandeado (MIB) es consecuencia de que en inmunoblot muestra una forma bandeada múltiple, el MIB se demostró, usando suero de pacientes infectados con *U. urealyticum* y anticuerpos monoclonales (son hechos en cultivos celulares de mieloma múltiple, mientras que los policlonales son realizados en conejo) contra *Ureaplasma*. Además, presenta una tasa alta de variación de tamaño (presenta aproximadamente 1230 bp y un peso molecular entre 24 y 110 kD), siendo mayor en cepas invasivas.⁽³⁰⁾ El antígeno MIB ha sido mencionado como un importante factor de virulencia.

El antígeno presenta las siguientes propiedades importantes:

1. *Es específico de especie.* Ninguno de los anticuerpos monoclonales dirigidos a este antígeno mostraron reacción en presencia de otros Mycoplasmas.^(31, 30)
2. *Presenta epitopos de reacción cruzada y epitopos específicos de serovar.*^(3, 30)
3. *Son producidos tanto in vivo como in vitro.* El antígeno es detectado en cepas de laboratorio, aislados clínicos, y muestras de tejido. También está presente en aislados de placenta, pulmón y líquido cefalorraquídeo en donde *Ureaplasma* causó enfermedad invasiva.^(3, 30)
4. *Presenta una alta tasa de variación de tamaño estructural in vivo e in vitro,* sin embargo, después de que la cepa de referencia (serovar 3) fue subclonada y estudiada por medio de inmunoblotting con el anticuerpo monoclonal anti-serovar 3, la masa molecular del antígeno, mostró una caída en la banda superior de la forma de escalera. La tasa de variación del tamaño del antígeno fue de 10^9 células por generación. El antígeno en los aislamientos clínicos (incluyendo aislamientos de

pulmón y de líquido cefalorraquídeo) que fue reconocido por el anticuerpo monoclonal, también mostraron variación en el tamaño. Este antígeno de variación de tamaño es análogo al antígeno V-1 presente en *Mycoplasma pulmonis*, el cual, es un patógeno de pulmón y tracto genitourinario en roedores⁽¹⁰⁾. En este microorganismo la única diferencia entre la cepa virulenta de la no virulenta es la variación de tamaño del antígeno, y por consecuencia la diferencia en la severidad de la enfermedad y en la incidencia de muerte^(1,10).

5. Los Anticuerpos contra el antígeno MB de *U. urealyticum* están entre los predominantes reconocidos durante las infecciones causadas por *U. urealyticum* en humanos.
6. Los anticuerpos contra los antígenos MB inhiben el crecimiento de los organismos *in vitro*. Esto se demostró en el suero 3 y 8, indicando la importancia potencial de este antígeno para defensa del huésped. Al exponer los anticuerpos monoclonales al antígeno MB, no solo se limita la infección invasiva de uno o algunos serovares en particular, sino que, también se muestra que los serovares aislados de pacientes con *U. urealyticum* invasivo expresan el antígeno multibandeado de tamaño variable^(1,10).

Lo anterior indica que el antígeno MB presente en *U. urealyticum* y el presente en otros Mycoplasmas, pueden ser de importancia para la interacción con las células del huésped. El antígeno superficial MB de *U. urealyticum*, contiene tanto el suero como el biovar, y se reconoce mejor en humanos durante la infección. El antígeno presenta alto rango de variación de tamaño, esto es fenotípicamente similar a los presentados en otros Mycoplasmas. Estos factores muestran la necesidad de caracterizar los epitopos y determinar de que modo estos epitopos pueden ser afectados por la variación del tamaño e influir en la producción de anticuerpos potencialmente responsables de la protección. Este reconocimiento, además, es importante para entender la ruta del antígeno y asociar si la variación del tamaño juega un papel con el éxito o fracaso del microorganismo para producir la enfermedad.^(1,10)

Existe diferencia entre la masa molecular aparente del antígeno MB (67.8 kDa) determinado por SDS-PAGE (Electroforesis en gel de poliacrilamida con solución de dodecil sulfato de sodio) y la masa molecular deducida (42,863 Da) con base en la secuencia de aminoácidos predicha del MB. Estos datos sugieren que la estructura presenta seis repeticiones de aminoácidos, que tienen capacidad de impedir la desnaturalización del MB en SDS PAGE. Entre los dos aminoácidos hubieron dos residuos cargados, uno con carga positiva (Lisina) y uno con carga negativa (ácido glutámico), así como una prolina. En concreto, los efectos conformacionales de un sin número de giros beta impartidos por la prolina y el potencial de interacción intra e intermolecular proporcionados por los residuos cargados pueden dar resistencia a la desnaturalización de la proteína MB.⁽¹⁰⁾

La variación de tamaño de la proteína y los cambios en la estructura de repetición se han detectado en eucariotes y procariotes patógenos. Por ejemplo, muchos antígenos de superficie expresados en las diferentes etapas de la malaria, presentan repeticiones^(1, 10). También se han observado regiones de repetición en el *Streptococcus* del grupo A que codifica a la proteína M y que se asocia con la actividad antifagocitaria, en la proteína C-alfá de *Streptococcus* del grupo B que se asocia con la resistencia producida por la muerte de los leucocitos PMN, en la proteína de membrana IIS en *Neisseria*, en la proteína de superficie de *Streptococcus pneumoniae*, en *Mycoplasma pulmonis*, en *Mycoplasma hyorhinis* (un patógeno de cerdos) donde es responsable de la variación del tamaño como ocurre en *Ureaplasma* aunque no se relacionan genética ni patogenicamente, estos presentan sistemas similares^(1, 10).

- ASPECTOS CELULARES INMUNES

La habilidad que tienen los neutrófilos para fagocitar las células de *Ureaplasma urealyticum* se demuestra con quimioluminiscencia y por microscopía electrónica. En estos métodos se observa que el microorganismo no muere en presencia del complemento y en ausencia de anticuerpos como es en pacientes con hipogammaglobulinemia^(1, 20).

- RESPUESTA INMUNE

Humoral: El resultado por medio de inmunoblot con suero humano y antisuero de conejo, sugiere que posiblemente existe un antígeno proteico de *U. urealyticum* que se encuentra implicado en la respuesta inmune. El hombre con uretritis no gonocócica (NGU) presenta una caída en el título de anticuerpos para *U. urealyticum* que se detecta por inmunoensayo o por inhibición de metabolismo esta caída se presenta de 10 a 35 días después de la primera muestra. Estos hallazgos se han visto en pacientes voluntarios y en experimentos animales.

Los títulos de anticuerpos contra *Ureaplasma* fueron cuatro veces mayores en el feto que en la madre, siendo tres veces mayores en el feto abortado que en el no abortado. También se han detectado anticuerpos contra *Ureaplasma* en niños con problemas respiratorios y si el número de anticuerpos encontrados en el niño son tan altos como los maternos, se sugiere, que la infección ocurre en útero. Estos resultados serológicos pueden ser usados para investigar el rol de *U. urealyticum* y el bajo peso al nacer^(17, 20) y además considerar como factor de riesgo hasta un 30% a las mujeres quienes presenten respuesta a anticuerpos altos de tener niños con bajo peso al nacer⁽¹³⁾ que aquellas mujeres quienes no tuvieron respuesta a anticuerpos tan altos y en ellas el factor de riesgo se reduce al 7.3% de tener hijos con bajo peso al nacer.^(13, 20)

Mediada por células: La información relacionada a la infección con *U. urealyticum* es escasa. La transformación de linfocitos en dos varones voluntarios infectados intrauretralmente no se detectó. Sin embargo, cuando existe transformación de linfocitos indica que existió una respuesta previa *in vivo*. En un ensayo para implicar el organismo en la etiología de la enfermedad consistió en considerar células sinoviales de pacientes con artritis reactiva adquirida sexualmente (enfermedad de Reiters) teniendo gran respuesta a *Ureaplasma urealyticum*, lo cual sugiere el papel de este en artritis sexualmente adquirida.⁽²⁰⁾

- **EPIDEMIOLOGIA:**

Cassell y colaboradores aislaron un 14 % de *Ureaplasma*, colectados de aspirados endotraqueales de niños en las primeras 12 a 24 h después del nacimiento con peso menor de 2500g. El nacimiento fue mediante cesarea con membranas intactas lo que indica que la transmisión del útero ocurre comúnmente en niños prematuros. La transmisión nosocomial en una sala de recién nacidos o de terapia intensiva neonatal de Micoplasmas no ha sido descrita o se desconoce.⁽¹⁵⁾ La colonización de niños de término (de 37-38 semanas de gestación) es relativamente pasajera, con una caída en la proporción de aislamiento después de los tres meses de edad.⁽¹²⁾ Los niños mayores y adultos sin actividad sexual son colonizados en menos del 10%.⁽¹⁵⁾

Se considera que el reservorio de *Ureaplasma* en humanos es el tracto genital, sin embargo, la infección se encuentra raramente durante la pubertad. Probablemente la colonización es el resultado de la actividad sexual y ocurre en más del 80% de individuos quienes han tenido tres o más parejas sexuales.^(13, 12, 21)

- **INFECCIONES CLINICAS PRODUCIDAS POR *Ureaplasma urealyticum*.**

Uretritis no gonocócica en hombres y mujeres: La inoculación de *Ureaplasma* en animales y humanos y la observación en pacientes inmunocomprometidos proporcionó la evidencia que éste es capaz de producir NGU en ausencia de clamidia.⁽²⁰⁾

La frecuencia de aislamiento de *Ureaplasma* en hombres asintomáticos sugiere que para poder desarrollar la enfermedad, el microorganismo se une a factores de predisposición como por ejemplo falta de inmunidad en la mucosa, esta es la explicación por la cual solo algunos individuos desarrollan la enfermedad. *Ureaplasma* es responsable para algunos casos de síndrome uretral agudo.⁽²⁰⁾

Prostatitis y epididimitis: *Ureaplasma* puede tener acceso a la próstata durante una infección aguda de uretra, estos aislamientos son más frecuentes en pacientes con uretroprostatitis aguda que en controles. Los pacientes con $>10^3$ organismos en fluido prostático, tienen que recibir terapia. No se ha aislado de biopsias de próstata. En contraste se ha recuperado directamente del epidídimo de un paciente con orquiepididimitis aguda no clamidial, no gonocócico y con desarrollo de anticuerpos específicos, lo cual muestra que *Ureaplasma urealyticum* puede ser una causa no común de la enfermedad.⁽²⁰⁾

Implicación en el tracto urinario: La acción de la ureasa de ciertas bacterias, principalmente *Proteus*, produce cálculos infecciosos. *Ureaplasma* por virtud de esa ureasa produce cristalización in vitro de fosfato de calcio en orina y produce cálculos en modelos animales. *Ureaplasma* se encuentra más frecuentemente en pacientes con cálculos infecciosos que en pacientes con cálculos metabólicos, y se sugiere que este se encuentra implicado cuando existe otra bacteria ureasa positiva. No existe evidencia que cause pielonefritis.⁽²⁰⁾

Infecciones extragenitales: *Ureaplasma* es el microorganismo responsable de que pocos individuos con hipogamaglobulinemia desarrollen artritis supurativa, esta bacteria se aísla sola o asociada con otros microorganismos. La artritis en hipogamaglobulinemia no se confunde con la causada después de una infección genital en pacientes inmunocomprometidos, algunas veces se asocia con abscesos subcutáneos, uretritis persistente y uretritis-cistitis crónica.^(7, 20) *Ureaplasma* se aísla de todos los sitios inflamados (como por ejemplo rodilla, codos), pero en pacientes con terapia inmunosupresiva no parece ser tan frecuente como *Mycoplasma hominis*, sin embargo, en algunas ocasiones se han encontrado ambos: *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis* a partir de la muestra de líquido sinovial.^(7, 14, 20)

Implicación en el tracto reproductivo y desórdenes asociados: La posibilidad de que *Ureaplasma* juegue un papel importante en el desarrollo de la infertilidad humana fue lo primero en suponerse hace más de 20 años, pero la asociación permanece en reflexión. Se ha asociado con la alteración en la movilidad del esperma.⁽²⁰⁾

En la colonización del tracto genital inferior femenino, *Ureaplasma* puede encontrarse en el cervix o vagina del 40 % al 80% de mujeres asintomáticas sexualmente maduras. La colonización se relaciona con la juventud, estado socioeconómico bajo, actividad sexual con múltiples parejas, raza negra y uso de anticonceptivo oral.⁽⁹⁾ El papel de *Ureaplasma urealyticum* en la enfermedad humana relacionada con el embarazo es muy controversial. Está claro que la colonización cervicovaginal de *U. urealyticum* no es predictivo del resultado adverso del embarazo, pero también está claro que *Ureaplasma urealyticum* puede invadir el tracto genital inferior y hacerlo solamente en una subpoblación de individuos.^(9, 11) Además se ha aislado del fluido amniótico de la mujer con corioamniotitis severa quien subsecuentemente experimenta labor pretermina.^(13, 20)

Se ha aislado en una pequeña población de mujeres quienes presentaron fiebre postparto y parece ser que puede inducir la fiebre por causa de la endometritis.⁽¹⁾

En abortos se aisló más frecuentemente en los de tipo espontáneo que de tipo terapéutico y la recuperación de *Ureaplasma* no es de órganos superficiales, sino de contaminación de órganos internos, además, se aisló de mortinatos (nacidos muertos) y de infantes pretermino.^(3, 20)

Enfermedad en el recién nacido La incidencia de nacimientos de niños prematuros en países en vías de desarrollo varía, en Latinoamérica se presenta incidencia desde el 8% en Colombia hasta 20% en Guatemala.⁽¹²⁾ En México la UNICEF reporta una incidencia de 12%, sin embargo, algunas instituciones reportan incidencias muy altas (30%)⁽¹³⁾ En un estudio en la ciudad de México en donde incluyeron a 100 recién nacidos prematuros, en los cuales se demostró la presencia de *U. urealyticum* en el 13%. Estos niños presentaban enfermedad respiratoria y el diagnóstico se realizó por medio de cultivo clínico.⁽¹⁷⁾

La neumonía congénita o neumonía neonatal, durante el nacimiento casi siempre se acompaña de corioamniotitis que es causada por *Ureaplasma urealyticum*, sin embargo no se cree que *U. urealyticum* sea el factor causal para el resultado adverso del embarazo, es decir, existen otros factores que pueden confundir como fisiológicos, anatómicos u otros microorganismos.^(11, 14) La transmisión vertical (de la madre al recién nacido ya sea por vía transplacentaria o por el canal de parto) del *Ureaplasma urealyticum* ocurre a grados del 45% al 66% en niños de término completo y 58% de niños pretermino.⁽¹³⁾ Las evidencias indican que *Ureaplasma urealyticum* es el microorganismo más común aislado del sistema nervioso central y el tracto respiratorio inferior de niños recién nacidos, en especial los nacidos prematuramente.⁽¹¹⁾

El aislamiento del microorganismo a partir del cultivo puro de líquido pleural, muestras de biopsias de pulmón, tejido de pulmón en autopsias de niños con neumonía, al compararse con las lesiones histológicas similares en los pulmones de ratones recién nacidos y primates prueban que este organismo es una causa de la enfermedad respiratoria en niños recién nacidos. *Ureaplasma urealyticum* ha sido aislado de pulmones afectados, en ausencia de bacterias, virus, hongos y clamidia y en la presencia de corioamniotitis. El *Ureaplasma* puede inducir la cilioestasis y lesiones mucosales, pues se ha aislado de cultivos del órgano traqueal fetal humano.⁽¹⁵⁾

Además de la dificultad respiratoria aguda, la supervivencia de algunos niños con muy bajo peso al nacer ha llevado al reconocimiento de la entidad clínica llamada displasia broncopulmonar también conocida como enfermedad pulmonar crónica (CLD) de la prematuridad. Ha habido poco progreso en lo referente a reducir la mortalidad de la CLD que afecta del 15 al 38% de los sobrevivientes de la enfermedad pulmonar neonatal.⁽¹⁶⁾

Cultivos nasofaríngeos y traqueales para el *Ureaplasma urealyticum* obtenidos de 1-3 días y 13-15 días después del nacimiento resultaron positivos 17 de 93 pacientes (aproximadamente el 18%), los niños nacidos vaginalmente eran 4-5 veces más probables de ser colonizados que los niños nacidos por cesárea. De este trabajo⁽¹¹⁾ se concluyó que la colonización por *Ureaplasma urealyticum* está asociada con la CLD, independientemente de los efectos de ventilación, edad gestacional y severidad de la enfermedad respiratoria, además se observó que existían > 2 leucocitos polimorfonucleares en el aspirado traqueal a 1-3 días de edad en comparación con niños no colonizados. Los niños < 1000 g no sólo eran más probables de desarrollar la CLD sino también 2 veces con mayor probabilidad de morir.⁽¹¹⁾

Como se ha visto, el neonato pretérmino constituye un huésped diferente al de mayor edad. Un estudio realizado en el Hospital del IMSS en la ciudad de México, el cual incluye el cultivo clínico de 100 infantes, demostró la asociación entre *Ureaplasma urealyticum* y la enfermedad respiratoria en el 13% de los recién nacidos pretérmino, de estos infantes infectados el 31% fallecieron.⁽¹²⁾

En algunos trabajos se sugería que los serotipos unidos a las condiciones del paciente juegan un papel en la enfermedad causada por *U. urealyticum*. Sin embargo, no están claros los serotipos predominantes en los aislamientos clínicos de niños con enfermedad respiratoria.⁽¹⁶⁾ Actualmente se menciona que la variabilidad antigénica y los factores del huésped son más importantes que los diferentes biovars o serotipos de *U. urealyticum* como factor de riesgo de la enfermedad.⁽¹⁴⁾

Ureaplasma junto con *M. hominis* es capaz de invadir el líquido cefalorraquídeo y el infante prematuro está particularmente expuesto sobre todo, en los primeros días de vida a enfermedad respiratoria o hidrocefalia. Puede provocar meningitis de no grave a grave. Algunos investigadores consideran que *M. hominis* en unión con *U. urealyticum* es una de las causas más comunes de la infección en sistema nervioso central de neonatos. El establecimiento de estos microorganismos en huéspedes diferentes al neonato es totalmente raro.^(13, 20)

Infecciones experimentales en animales

La inoculación de *Ureaplasma urealyticum* en ratas da como resultado la producción de cálculos. *Ureaplasma* se multiplica y sobrevive por más de tres semanas después de la inoculación. La obstrucción experimental en tracto urinario superior de perros les causa nefritis intersticial crónica y se acompaña de una respuesta a anticuerpos.⁽²⁰⁾

La inoculación intraarticular en chimpancé, con cepas de *U. urealyticum* aisladas de un paciente con hipogamaglobulinemia le causó artritis severa, lo cual sugiere que *Ureaplasma* puede causar artritis en humanos inmunocomprometidos.⁽¹³⁾

Después de la inoculación la enfermedad no se produce en el tracto reproductivo de monos hembra. Es posible que colonice la vagina y el tracto genital superior pero solamente después de tratarse con estradiol.⁽²⁰⁾

Además, las cepas de *Ureaplasma* aisladas de niños con neumonía congénita producen neumonía en ratones recién nacidos, por lo tanto, se prueba nuevamente que *Ureaplasma urealyticum* es capaz de producir neumonía en recién nacidos.^(1, 20)

La neumonía producida en ratones recién nacidos se resuelve espontáneamente, pero la exposición a oxígeno incrementa la respuesta inflamatoria hasta un 80% y después viene la muerte. Es obvia la relevancia de la neumonía en infantes humanos y la presencia de síndrome respiratorio.⁽¹⁾

Williams et al en 1993, propusieron un primate como modelo para producir la infección por *U. urealyticum* semejante a la ocasionada en prematuros con enfermedad en la membrana hialina. A partir de cultivos positivos de bebés con peso al nacer \leq 1000 g en los cuales se asoció con CLD y muerte, ellos colonizan con *Ureaplasma urealyticum* a tres mandriles prematuros (de 140 días de gestación) y comparan los resultados patológicos con animales control no inoculados. Los animales se inocularon por vía endotraqueal y se sometieron a las condiciones como se encuentran los niños, se intubaron y se expusieron a oxígeno. Todos tuvieron enfermedad en membrana hialina indistinguible de la enfermedad provocada en infantes humanos e infección con *U. urealyticum*. Las muestras de fluido traqueal, nasofaríngeo, líquido pleural y en la necropsia de tejido de pulmón presentaron cultivo positivo. Solo en un animal se obtuvo cultivo positivo de sangre. Los tres animales inoculados, después de 6 días de ventilación presentaron bronquiolitis y la examinación patológica mostró ulceración epitelial que no se presentó en los casos control. Por lo cual en primates *Ureaplasma* es capaz de causar lesiones pulmonares con enfermedad en la membrana hialina.

- **DIAGNOSTICO:**

- Cultivo.**

- Actualmente, el diagnóstico de la infección causada por *U. urealyticum* necesita de cultivo, el cual, es un procedimiento largo (el cultivo tarda de 3 a 5 días de incubación como mínimo o hasta 15 días en medio líquido y menos de 30 días en medio sólido para que el cultivo pueda confirmarse como negativo), costoso y requiere de práctica por lo tanto, el microorganismo es problemático y es por esta razón que muchos laboratorios no realizan el diagnóstico para *Ureaplasma*.⁽²¹⁾

Payne y col. compararon la sensibilidad de dos métodos de cultivo derivados de un método que llamaron 1, este método consistía en transferir la muestra en caldo 2SP para posteriormente sembrarse en caldo U9B y agar A7. En el método 2 la muestra se transportaba en caldo U9B, de este se realizaban 5 diluciones en el mismo U9B y en agar A7. El método 3 fue similar al método 2 la única variación fue que se transfirió y sembró en caldo 10B. Comparando los tres anteriores métodos de cultivo, el método 1 y 2 presentaron 15 positivos de 66 muestras, los métodos 1 y 3 11 positivos de 36 muestras, sin embargo, en el método 2 presento 2 muestras que fueron falsas negativas al comparar con el primer método, el método 3 presentó mayor número de muestras positivas, es decir, falsos positivos en comparación con el método 2. Es importante saber que el método de cultivo empleado puede influir en los resultados.⁽³¹⁾ El caldo 10B de Shepard combinado con agar A7 o agar A8 son los medios más usados y más satisfactorios.⁽³¹⁾

Serología.

Métodos inmunológicos. En un proceso infeccioso activo se puede medir el anticuerpo específico contra *U. urealyticum* utilizando la prueba de fijación del complemento, inhibición del desarrollo e inhibición metabólica. Sin embargo estos métodos están limitados por la dificultad y la falta de habilidad para distinguir las respuestas producidas por los diferentes serovares. Se ha encontrado respuesta elevada a anticuerpos en neonatos con enfermedad respiratoria y fetos nacidos muertos, también se observa aumento en la respuesta de anticuerpos en niños de término con enfermedad respiratoria si se compara con niños de término sin presencia de enfermedad.^(32, 33)

Prueba por inmunoperoxidasa: Es un ensayo alternativo al método de inhibición metabólica usando un antígeno completo y la prueba de inmunoperoxidasa de Polack Vogelzang y col. El antígeno se crece en agar, se inactiva con timerozal y puede ser almacenado en contenedores sellados hasta por 6 meses. La sensibilidad de este método es 100 veces mayor que la prueba por inhibición metabólica. Con el uso de este método se confirmó que existe un anticuerpo serovar específico para la respuesta a IgG e IgM en humanos.⁽³³⁾

ELISA: Se han desarrollado una serie de intentos para obtener un diagnóstico por el método de ELISA, sin embargo, el haber trabajado con diferentes tipos de inmunoglobulinas en cada estudio, no proporciona homogeneidad para tener como referencia una inmunoglobulina específica y así poder detectar anticuerpos contra *Ureaplasma* y cada uno de sus serovares, por esta causa es difícil realizar el método de diagnóstico por ELISA.^(3, 33)

El antígeno en ELISA es una fracción de la membrana de naturaleza proteica y soluble, se prepara a partir de microorganismos cosechados por centrifugación y posteriormente lisados.⁽³³⁾

Cassell desarrolló un ELISA utilizando como antígeno un lisado de células completas y la respuesta de anticuerpos fue tomada de una población bien determinada de hombres con Uretritis no gonocócica, los anticuerpos detectados (IgG, IgM e IgA) fueron significativamente altos en comparación con los anticuerpos obtenidos del suero de personas sin infección.⁽³⁾

Dinsmoor, utilizó el método de ELISA para examinar neonatos de término que adquirieron la infección amniótica al nacimiento, en algunos neonatos se encontró IgG y se consideró como de origen materno. Cinco neonatos tuvieron IgM sin evidencia de infección. En este trabajo no se reportan los serovares a los cuales fueron dirigidos los anticuerpos.⁽³³⁾

En resumen, la serología es una prueba diagnóstica que no es conveniente, tiene problemas técnicos como por ejemplo que no distingue las inmunoglobulinas de los diferentes serovares de *Ureaplasma*, los diferentes antígenos presentan variabilidad, y en el caso de determinar IgG en neonatos, la muestra se toma a las 3 semanas después del nacimiento, lo cual es mucho tiempo para ser utilizada como prueba de diagnóstico si tomamos en cuenta que el recién nacido pretermino requiere de atención inmediata.^(4,5) En la respuesta de anticuerpos entre individuos son comunes los resultados falsos negativos y los falsos positivos, en cuanto al neonato, los anticuerpos maternos pueden ser detectados en lugar de los anticuerpos correspondientes al neonato y confundir la prueba.⁽³⁾

Por lo tanto es necesario un método para identificación de *U. urealyticum* seguro, rápido, sensible y específico para dar un tratamiento oportuno. Buscando estos fines se desarrolló el método de PCR.⁽³⁾

PCR:

La técnica de PCR es de gran utilidad para el diagnóstico rápido de aquellas bacterias cuya identificación es difícil por el método de cultivo y pruebas bioquímicas.

La amplificación de las secuencias genéticas específicas pueden detectar al microorganismo en menos de 24 horas mediante la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR). Hay únicamente dos secuencias publicadas del gen de *U. urealyticum* que podrían usarse como blanco para la amplificación por PCR. El Gen 16SrRNA y los genes estructurales de la ureasa, sin embargo, el gen 16SrRNA no es adecuado para la identificación específica porque está íntimamente relacionado con *M. pneumoniae*.⁽⁴⁾ En contraste los genes estructurales de ureasa contienen secuencias únicas que no están presentes en otros Mycoplasmas; tiene la ventaja de presentar homología limitada y localizada entre los genes de ureasa del *U. urealyticum* y los de otras bacterias que

producen ureasa, sin embargo, tiene la desventaja de que clasifica mal a los serotipos 10 y 12 que pertenecen al biovar 2 y no al biovar 1.⁽⁴⁾

La diversidad y especificidad del biovar está codificada en el Gen de antígeno mayor, el cual se designa como *Gene Multibanded* (GMB) (ver fig. 1 en la página 22). Este Gen fue clonado, secuenciado y puede ser utilizado para desarrollar la PCR, con el objeto de conocer la prevalencia de los serovares y biovars. Este Gen está presente en los 14 serovares de *Ureaplasma* de origen humano, al parecer se presenta en todos los aislados clínicos de *U. urealyticum*. Es por este motivo que se han propuesto dos oligonucleótidos para la evaluación diagnóstica con PCR basándose en la secuencia de este gen.⁽⁵⁾

El gene codificador del antígeno multibandeado consta de un gran armazón de 1230 bp que codifica 409 residuos de aminoácidos. Tiene una masa molecular predictiva de 42,863 Da. La N terminal consta de una marca peptídica típica de un procarionte, seguida de una secuencia de membrana que ataca al sitio lipoproteico (cisteína). Esta marca peptídica puede tener 29 aminoácidos de largo y presenta una región hidrofóbica.

Siguiendo hasta 451 bp en la secuencia del DNA, (secuencia de aminoácidos **GKEQPA**: G = Glicina, K = Lisina, E = Acido glutámico, Q = Glutamina, P = Prolina, A = Alanina) se mostró una región con 18 nucleótidos que presentaban unidades de repetición idénticas. El número de copias de repetición se calculó de la siguiente manera: primero se seleccionó la región de repetición usando endonucleasas de restricción, posteriormente se hicieron fragmentos de DNA de diferentes largos digeridos en un plásmido y por último el número de copias se calculó por medio de corrimiento electroforético en gel de agarosa. Esta región contiene 42.5 repeticiones. El análisis de la secuencia de aminoácidos del antígeno MB predice que la región carboxi repetida es hidrofílica, y se localiza en la superficie del antígeno.

El análisis de la secuencia del DNA del gene del antígeno MB mostró que codifica un polipeptido y presenta un sitio de acilación C-terminal en la región de repetición del antígeno MB lo que indica que la región probablemente es antigénica y se encuentra expuesta sobre la superficie. También se muestra que el antígeno es superficial, por medio de la reacción de inhibición con anticuerpos como ya se había mencionado antes. En concreto, estos datos sugieren la orientación del antígeno MB en la superficie de la membrana de *U. urealyticum*. La N terminal sirve de ancla sobre la membrana y la C-terminal de la región de repetición está expuesta al medio ambiente circundante al organismo y de este modo las defensas del huésped encontrarán primero al carboxi y después producirán el anticuerpo correspondiente.

El análisis por PCR indica que la región de repetición es la responsable de la variación del tamaño del antígeno y al relacionar la historia del paciente, la enfermedad y la variación de tamaño del antígeno MB, se asocian más frecuente con las manifestaciones patológicas.

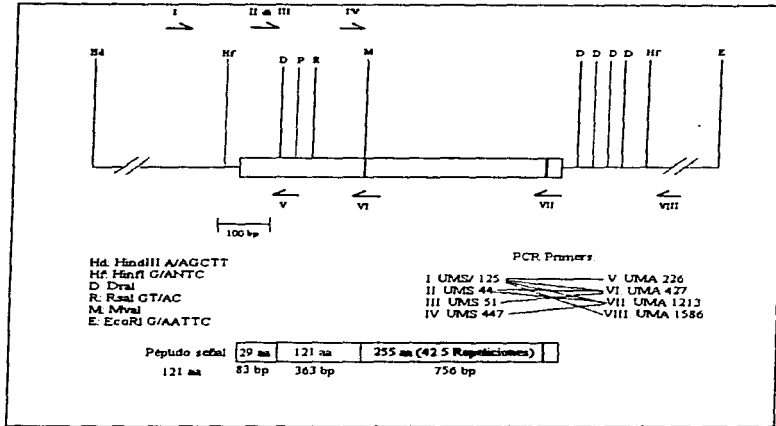


Figura 1
Fuente: referencia 28, 30

Mapa físico de los plásmidos recombinantes. La posición del serotipo 3 del gene MB de *U. urealyticum* están indicados por una barra sombreada que representa la región repetida. Las flechas indican la posición y orientación de los primers usados en la PCR para el estudio de la variación de tamaño.

Los oligonucleótidos son nombrados UMS o UMA para el antígeno MB de *Ureaplasma* codificando el sentido del primer (UMS) o el antisentido (UMA) del primer. El número de segmentos UMS o UMA se refiere a la localización como se muestra en el mapa del gene del antígeno MB.

• TRATAMIENTO

Considerando que *Ureaplasma urealyticum* carece de pared y por consecuencia de peptidoglicanos, las cepas no son susceptibles a antibióticos que actúan contra pared como los β -lactámicos, no son susceptibles a sulfonamidas o trimetoprim porque no sintetizan al ácido fólico. Son susceptibles a ciertos antibióticos que interfieren en la síntesis de proteínas como tetraciclinas o macrólidos, pero generalmente no a lincosamidas. Algunas cepas son susceptibles a aminoglicósidos, que se usan comúnmente en las infecciones producidas por microorganismos Gram negativos. Algunas quinolonas son activas *in vivo* e *in vitro*, pero su papel como agente terapéutico no se ha establecido en infecciones pediátricas debido a efectos en el desarrollo de cartilago.⁽²⁹⁾

Aunque la tetraciclina es el antibiótico de elección, se han demostrado cepas resistentes (21, 34).

Los aminoglicósidos en neonatos no parecen ser efectivos contra *Ureaplasma urealyticum* (los aminoglicósidos se usan en bacterias Gram negativas)^(3, 34)

Los niños de el hospital de Alabama, en quienes se sospechaba de septicemia o se obtenían aislamientos de líquido cefalorraquídeo, torrente sanguíneo o tracto respiratorio inferior, recibieron tratamiento intravenoso con gentamicina por más de tres días, con buenos resultados.⁽³⁾

Para el 90% de las cepas de *U. urealyticum* la eritromicina es el antibiótico de elección, sobretodo para el uso en neonatos. La administración intravenosa de eritromicina presenta buena penetración en tejido, incluyendo pulmón.^(3, 34) Se sabe que existe resistencia a eritromicina en niveles altos > 100 $\mu\text{g/ml}$, pero es relativamente raro.^(3, 34)

El cloramfenicol presenta toxicidad en médula ósea, aunque su reacción *in vitro* contra las cepas de *Ureaplasma* es favorable.⁽³⁾

Clindamicina es un fármaco que no debe usarse empíricamente, porque existen cepas de *Ureaplasma* susceptibles a éste en muy bajas concentraciones.⁽³⁾

La doxiciclina debido a toxicidad no es una alternativa de tratamiento, excepto para niños en quienes se aisló *U. urealyticum* en líquido cefalorraquídeo.⁽³⁾

El tratamiento a tiempo reduce la mortalidad y morbilidad en los neonatos, especialmente aquellos con muy bajo peso al nacer, es por esto la importancia de un diagnóstico rápido.⁽³⁾

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Ureaplasma urealyticum es un microorganismo capaz de causar enfermedad respiratoria en niños recién nacidos pretérmino y se aísla con una frecuencia de 14-17% de acuerdo a estudios en otros países. Actualmente en México hay pocos estudios que indiquen la incidencia de *Ureaplasma urealyticum* en infección de vías respiratorias bajas por lo que es importante conocer la incidencia de *U. urealyticum* en la infección de vías respiratorias bajas en recién nacidos pretérmino.

Además el diagnóstico de *U. urealyticum* por el método de cultivo en caldo y placa puede tardar de 2 hasta 15 días. Por lo tanto, es importante evaluar la sensibilidad, especificidad, rapidez y la potencia diagnóstica que tiene el método de PCR para diagnosticar la infección causada por *U. urealyticum* en vías respiratorias bajas de niños recién nacidos pretérmino.

OBJETIVO

- Determinar la incidencia de *Ureaplasma urealyticum* como agente causal de la enfermedad respiratoria en niños recién nacidos pretérmino atendidos en hospitales del Valle de México.
- Evaluar la sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR para determinar la presencia de *Ureaplasma urealyticum* en comparación con la prueba de referencia (cultivo en caldo 10B y agar A8).

HIPOTESIS

- Se espera que la incidencia de la enfermedad respiratoria causada por *Ureaplasma urealyticum* en recién nacidos pretérmino sea mayor al 14%.
- Si realmente el método diagnóstico por PCR es sensible y específico al compararse con el cultivo en caldo 10B y placa de Agar A8, entonces se esperará que la sensibilidad, especificidad y potencia diagnóstica sean mayores del 80%.

DISEÑO DE LA INVESTIGACION

- **Tipo de estudio:**

Este es un estudio observacional, prospectivo, transversal, descriptivo.

- **Tamaño de muestra:**

Se incluye a 90 niños recién nacidos pretérmino atendidos en el IMSS en el Hospital de Gineco-obstetricia del Centro Médico "La Raza" y "Tlatelolco", se incluirán las muestras obtenidas en 8 Meses (de septiembre de 1995 a Mayo de 1996).

- **Criterios de inclusión**

Niños recién nacidos pretérmino (con un periodo de gestación de 23 a 34 semanas),
Presencia de insuficiencia respiratoria, y asistencia respiratoria con menos de 12 horas de intubación.
Peso mayor o igual a 550 gr; y
Estar dentro de los primeros 7 días de nacidos.

- **Criterios de exclusión:**

Niños pretérmino con enfermedad cardíaca y/o pulmonar congénitas.

- **Variables:**

Variable independiente: Metodología empleada en la técnica de cultivo y/o en la PCR.

Variable dependiente: Incidencia de la enfermedad causada por *U. urealyticum*.
Sensibilidad y Especificidad de la PCR.

• **Técnicas:**

I. Material:

Jarra de anaerobiosis (BBL)
Guantes (Ansell medical)
Caja petri (Corning)
Mechero
Pipeta graduada de 1, 2, 5 y 10 ml (Pyrex)
Porta objetos 27 X 75 (Corning)
Asas bacteriológicas
Hisopo estéril
Tubo de vidrio de 13 X 100 y de 18 X 150 (Pyrex)
Vasos de precipitado de 100 y 250 ml (Pyrex)
Micropipetas automáticas de 1000µl, 200µl, 20µl y 10µl (Labssystem, finnpipette)
Probetas de 40, 500 y 1000 ml (Pyrex)
Puente de tinción
Pinzas de disección
Puntas para micropipeta amarilla estéril
Puntas para micropipeta blanca con filtro y estéril
Gradilla
Gasas
Espátula
Barra magnética
Jeringa desechable de 5 y 10 ml (Plastipak)
Criotubo estéril (Nunc Inter Med)
Tubo Eppendorf estéril de 0.5 y 1.5 ml
Matraz Erlen meyer de 500 y 1000 ml (Kimax)
Papel parafilm (American Company)
Membrana de 0.22 y 0.45µm
Portafiltro

Material biológico:

Cepa de referencia serovar 3.
100 µl de aspirado traqueal de niños recién nacidos con enfermedad respiratoria en solución salina isotónica.

II. Equipo:

Campana de flujo laminar (Nuair)
Centrifuga (Sorvall RMC-14)
Balanza analítica (Sartorius)
Balanza granataria (Mettler-Toledo)
Vortex (Vortex-Genie mod K-550-G)
Potenciómetro (Beckman RS-232)
Autoclave (Interamericana)
Estufa (Lab line Instrumento Inc)
Microscopio (Nikon)
Baño de Agua (Bellco Glass Inc)
Parrilla (Multi-block)
Refrigerador a 4°C, -20°C, -70°C (Revco, Fisher Scientific, Freezer)
Termociclador (MJ Research Inc)
Lámpara de luz U V.
Cámara fotográfica (polaroid MP-4)
Película polaroid 5.5
Cámara para electroforesis (Stratagene)
Regulador (Life-Technologies)
Microscopio Estereoscópico (Zeiss)
Horno de microondas (Samsung)

IV. Reactivos:

Base de caldo Mycoplasma BBL (Becton Dickinson)
DNA de esperma Herring (Sigma)
Agua destilada y desionizada
Rojo de fenol 1% (Técnica Química)
Suero fetal bovino inactivo y filtrado (Sigma)
Cysteina 2 y 4% (Sigma)
Polienriquecimiento liofilizado (Bioxon)
Urea ultrapura 10% (Merck)
Cefobid
Amortiguador a pH 4 (Beckman)
Amortiguador a pH 7 (Beckman)
Proteinasa K (Sigma)
Gelatina (Sigma)
Amortiguador PCR
Trisma Base (Sigma)
K Cl (Merck)
MgCl₂ (Merck)
dNTP's
Primer 1

Primer 2
Ampli Taq (Perkin Elmer)
Aceite mineral estéril
Etanol puro (Merck)
Agarosa (Stratagene)
Acido Bórico (J. T. Baker)
Na₂EDTA H₂O (Sigma)
Glicerol Gel Loading Amortiguador 5X (Amesco)
Marcadores (Gibco BRL)
Bromuro de etidio (Sigma)
Caldo Soya Trypticase TBS (Difco)
Extracto de levadura (Difco)
Putrecina di-HCl (Sigma)
Agar exento de inhibidores (Merck)
Suero de Caballo (Gibco BRL)
GHL solución tripeptido (Sigma)
Base de agar chocolate (Bioxon)
Hemoglobina (Difco)
Base para agar sangre (Bioxon)
MacConkey (Bioxon)
Muller Hinton (Bioxon)
Cristal Violeta 90%
Solución de yodo
Medio de transporte Stuart
Alcohol 95%
Acetona
Safranina 99%

V. Kits Comerciales:

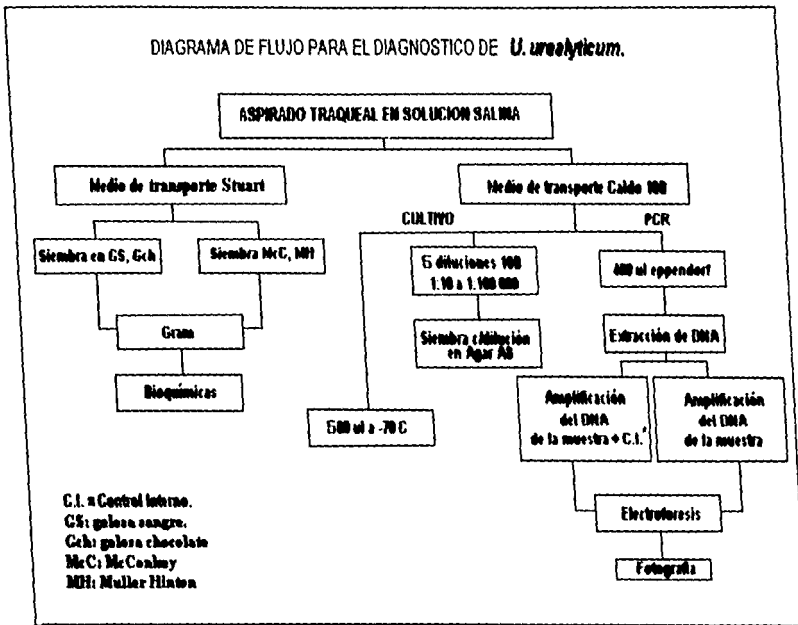
Cromatografía en columna Kit comercial QIAmp blood kit (QIAGEN)

FALTA PAGINA

No.

36

III. Método.



a) Toma de muestra:

Para el cultivo de *Ureaplasma urealyticum* se pueden utilizar especímenes líquidos tales como líquido amniótico, sangre, líquido cefalorraquídeo, orina, líquido pleural y secreciones traqueobronquiales.

Para nuestros fines se utiliza aspirado traqueal de infantes pretérmino con enfermedad respiratoria.

La muestra clínica se tomó durante los primeros 7 días de nacimiento y durante las primeras 12 horas de intubación. Los especímenes traqueales son obtenidos durante la succión de rutina de los pacientes que se encuentran con intubación endotraqueal, se introduce la cánula a través del tubo endotraqueal, en el extremo de la cánula se coloca una jeringa con 200 µl de solución salina isotónica no bacteriostática, posteriormente se aplica presión positiva con la finalidad de realizar lavado y por último se aspira con la misma jeringa. Es importante que la solución salina sea isotónica para impedir que la bacteria se lise, este fenómeno puede ocurrir porque el microorganismo carece de pared celular.

b) Transporte

A cada hospital se le proporcionan 2 medios de transporte:

- 1.- Caldo 10B.
- 2.- Medio de transporte Stuart.

1. Para el cultivo de *Ureaplasma* se envía el Caldo 10B y se inocular directamente en el momento de la recolección, ya que este microorganismo es muy sensible a las condiciones ambientales adversas; la proporción recomendada es 1:10 (0.1 ml de aspirado en 0.9 ml de caldo 10B), la muestra se transporta congelada en hielo seco para evitar daños al DNA del microorganismo.
2. El medio de transporte Stuart se utiliza para la búsqueda de otras bacterias que pudieran estar asociadas con la infección y además reconocer aquellas que sean Ureasa + y puedan interferir con los resultados en el cultivo en caldo 10B.

c) Cultivo de *Ureaplasma urealyticum*:

Las muestras son procesadas lo más pronto posible después de su toma aproximadamente 1 hora.

Cultivo en caldo 10B Del caldo de transporte 10B se realiza una serie de cinco diluciones en caldo 10B. Para la primera dilución se toma 0.1 ml de suspensión celular y se coloca en 0.9 ml de caldo 10B (dilución 1 : 10), de la primera dilución se toma 0.1 ml y se coloca en 0.9 ml de caldo 10B (dilución 1 : 100) y así sucesivamente hasta obtener una dilución 1 : 100,000.

Cultivo en agar A8: Se toman 20 µl de cada una de las diluciones realizadas en caldo 10B, colocándose en el agar A8, antes de la incubación se deja 20 minutos para que la gota se absorba en el medio.

Condiciones de incubación para el caldo 10B y agar A8. Las diluciones se incuban a 37° C, hasta observar un cambio de color (de amarillo a rosa debido a que el medio pasa de ácido a alcalino por la reacción de la ureasa producida por *U. urealyticum* y el cambio de color se presenta por el indicador rojo de fenol al 1%) o hasta un máximo de 15 días, si en este tiempo no se presenta el cambio de color, la muestra se considera como negativa. La lectura de los cultivos debe realizarse de 2 a 3 veces durante el día.

El agar A8 se incuba a 37° C en una atmósfera de 5-7% de CO₂, y humedad de 7-10 días. La atmósfera señalada se logra con el uso de la jara y la vela. Las placas se revisan diariamente con ayuda del microscopio estereoscópico para observar las colonias características de *Ureaplasma* de color café o negras por la reacción de la ureasa en presencia del CaCl₂ como indicador.

Interpretación de resultados: Se considera que un cultivo es positivo cuando en las diluciones existe un cambio de color y en el agar A8 se observan las colonias de *Ureaplasma urealyticum* de color café obscuro o negras.

d) Cultivo para otras bacterias:

El espécimen transportado en Stuart, se siembra en Agar chocolate, Agar sangre, Muller Hinton y MacConkey, por estria cruzada.

El Agar sangre y chocolate se incuban en una atmósfera de 5-7 % de CO₂ y los cuatro medios se incuban a 37°C., hasta 48 horas para asignarse como negativos. La identificación se realiza en base a la Morfología Colonial, Morfología Microscópica con Tinción de Gram y Pruebas Bioquímicas.

e) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):

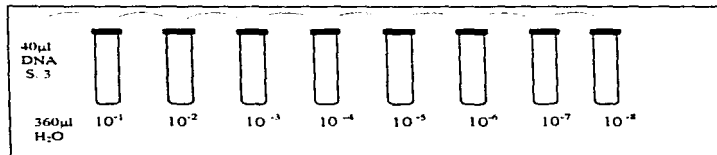
La prueba fue estudiada y optimizada con las cepas de referencia para los 14 serotipos como se describe en la referencia 28 para probar su especificidad y sensibilidad

Las precauciones para prevenir "Carry over"(acarreamiento de contaminación) fueron incluir el uso de 3 lugares diferentes, el primero se dedica al procesamiento de la muestra clínica, el segundo al establecimiento de la prueba de PCR y reactivos para esta, y el tercero para realizar electroforesis y analizar los productos amplificados

Preparación de la Muestra Antes de la Amplificación del DNA. Del medio de transporte 10B inoculado se toma una alícuota de 400 µl en un tubo eppendorf esteril de 1.5 ml (bajo esta condición se puede almacenar a -70°C hasta realizar la extracción de DNA).

Extracción del DNA: Para la extracción de DNA una vez descongelada la muestra se transporta en hielo, posteriormente se centrifuga a 14,000rpm a 4°C por 30 min. Se desecha el sobrenadante cuidadosamente pipeteando con puntas ART (Aerosol Resistant Tip), una vez obtenido el paquete celular se adicionan 100 µl de amortiguador de lisis de proteinasa K solución A - B, se incuba por 60 min, a 60°C en un baño de agua e inactiva a 95°C por 10 min. Las muestras se dejan 10 min a 4°C y después, en caso de no continuar con el análisis, se almacenan a -70°C hasta realizar la PCR. De esta extracción solo se toman 5 µl para el análisis por PCR.

Procedimiento para control positivo y control interno: De la extracción del DNA del serovar 3 a partir del plásmido de *E. coli* se realizan 8 diluciones en agua desionizada estéril:



Para los controles (positivo e interno) no se realiza extracción de DNA con proteinasa K , se realiza la PCR de las diluciones, posteriormente se realiza la electroforesis en gel de agarosa al 2%, se tiñe con bromuro de etidio, después se visualizan los productos de PCR con luz U.V.

A partir de esto se selecciona el control interno que será aquella dilución con menos número de copias (demostrada por la intensidad de la banda) El control positivo se selecciona de la dilución con un número de copias intermedio

Reacción en Cadena de la Polimerasa: Los primers usados para la tipificación del DNA para los dos biovares fueron el UM-1 (UMS 125) 5'- GTA TTT GCA ATC TTT ATA TGT TTT GC-3' y UM-2 (UMA 226) 5'- CAG CTG ATG TAA GTG CAG CAT TAA ATT C-3'

Para la amplificación se tiene un volumen total de la mezcla de reacción de 50µl (Solución maestra más templado(s) y contiene lo siguiente

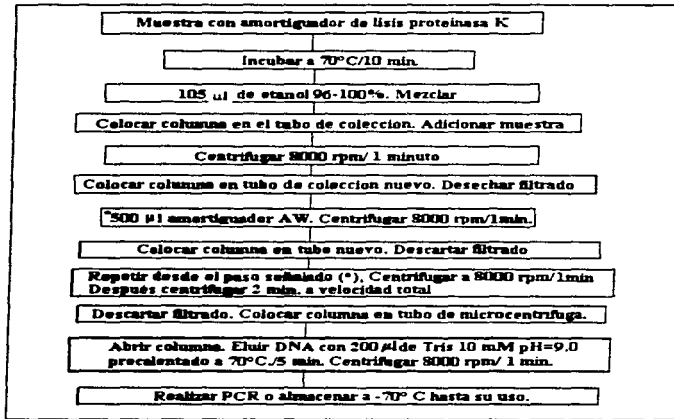
REACTIVO	µL POR MUESTRA S/CONTROL INTERNO	µL POR MUESTRA + CONTROL INTERNO
Agua estéril	28.8	23.8
Gelatina (0.01%)	5	5
Amortiguador de PCR (17.5%)	5	5
dNTP's (10 µmoles)	4	4
Primer 1 (UMS-125) (40 µmoles)	1	1
Primer 2 (UMA-226) (40 µmoles)	1	1
Taq (0.2U)	0.2	0.2
Aceite Mineral	1 gota	1 gota
Nota: Para adicionar la muestra y el control interno se realiza en el cuarto #1.		
Muestra (templado)	5	5
Control Interno (templado)	-	5
TOTAL	50	50

Para correr PCR se espera un mínimo de 7 muestras y además se somete al mismo tratamiento (desde la extracción hasta la observación de resultados) 2 controles negativos Agua estéril y caldo 10B; y un control positivo serovar 3.

Una vez realizada la mezcla de reacción se usa un controlador térmico, para que la desnaturalización se realice a 94°C por 20 segundos. El alineamiento a 57°C por 60 segundos y la extensión a 72°C por 60 segundos. Esto se realiza con una serie de 35

ciclos, la extensión final se realiza a una temperatura de 72°C por 5 minutos y mantener a 4°C por 99hr, 59minutos, 59segundos (Nota. de esta forma se programa el termociclador para preservar la temperatura y la muestra se conserve).

Muestras con presencia de inhibidores: Las muestras que carecen de amplificación después de la adición del control interno, se les realiza el siguiente procedimiento:



Preparación de la Electroforesis: Los productos de amplificación se observan por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 2%, utilizando como Amortiguador TBE 1X (Trisma base + ácido Bórico + EDTA). Disolver completamente la agarosa en un matraz Erlenmeyer, éste se coloca en el horno de microondas por 3 minutos.

Dejar enfriar de 7 a 10 minutos antes de vaciar en la cámara de electroforesis. Después de vaciar en el molde, se eliminan las burbujas de aire y se permite polimerizar al gel por 30 minutos aproximadamente.

Una vez solidificado el gel, retirar el peine y colocar los ml necesarios de Amortiguador TBE que cubran al gel. Posteriormente se carga el gel con la siguiente mezcla.

Colocar 11 tubos eppendorf, el primero se etiqueta como "Marcadores", se adicionan 5 µl de amortiguador de carga para el gel de glicerol 5X más 5µl de marcadores de peso molecular más 15 µl de agua desionizada estéril. Esta mezcla se coloca en el pozo número 1 del gel.

Para los tubos restantes se adicionan 5µl de amortiguador de carga para el gel de glicerol 5X más 20µl de productos de PCR, incluyendo al control positivo (se coloca en el pozo número 2 del gel) y controles negativos (medio 10B que se coloca en un pozo intermedio y agua desionizada estéril que se coloca en el último pozo del gel).

Correr el gel de electroforesis a 150 mVolts por aproximadamente 1 hora posteriormente el gel se tiñe con bromuro de etidio por 15 min y los productos de DNA se visualizan por fluorescencia obtenida con una lámpara de luz U.V. (260 nm, el número de pares de bases es aproximadamente de 403).

Interpretación de resultados: Por último se le toma una fotografía en la cámara polaroid. La apertura de coloca 5.6 y la película se expone por 22 segundos. Si el resultado es positivo la banda originada por el efecto de la luz U.V y el DNA teñido con bromuro de etidio aparece aproximadamente a la altura de la banda del control positivo.

- **Diseño Estadístico:**

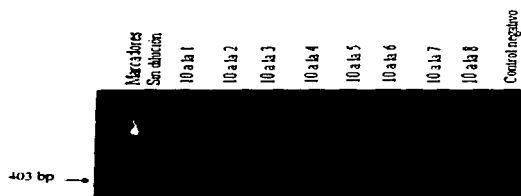
Para analizar la sensibilidad y especificidad del método de PCR en comparación con el cultivo en caldo y placa se realiza mediante el teorema de Bayes (tabla de contingencia de 2X2).

Por medio de χ^2 se evaluará la influencia del sexo en la incidencia, tomando como significativo el valor de $P < 0.05$. La prueba de exacta de Fisher se considerará en los datos con menos de 30 muestras.

PCR

Por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa se analizaron 5 μ l de templado (a partir de la extracción de 400 μ l) de cada una de las 90 muestras de aspirado traqueal provenientes de niños recién nacidos pretérmino con enfermedad respiratoria. En la figura 1 se muestra el análisis de los productos de PCR obtenidos del DNA de la cepa de referencia de *U. urealyticum* serovar 3, el cual, fue sintetizado en *E. coli* (plásmido) posteriormente fue extraído y purificado. En la figura 1 se representan las 8 diluciones del DNA de referencia a partir de las cuales fue seleccionado la dilución 2 como control positivo, y como control interno la dilución 7, conforme a las características mencionadas en el diseño de la investigación.

Figura 1 Diluciones del DNA de *Ureaplasma urealyticum* del serovar 3 de referencia.

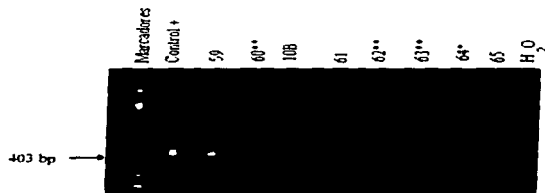


Productos de PCR de la cepa de referencia de *U. urealyticum* en el gel de agarosa después de la Tinción con bromuro de etidio. La primera columna representa los marcadores de peso molecular (103 pares de bases), la segunda columna representa el producto amplificado de la muestra sin dilución, posteriormente se mencionan las diluciones a la cual se encuentra el producto amplificado y por último se tiene al control negativo (H₂O), como se encuentran marcados respectivamente en la figura.

En la figura 2 se analizan los productos de PCR para las muestras etiquetadas con las claves R059 a la R065, se observan tres de las cinco muestras que fueron positivas por medio del método de PCR mientras que por el método de cultivo fueron negativas (R060, R062 y R063). En la figura se observa una banda de ligera intensidad en las muestras R062 y R063.

En esta misma figura se presenta una de las dos muestras que fue negativa por PCR, pero positiva por cultivo (R064). En este caso la Reacción en Cadena de la Polimerasa se realizó a partir de la muestra original, es decir sin incubar previamente antes de la extracción de DNA.

Figura 2. Productos de amplificación por PCR a partir de muestras clínicas.



Gel de agarosa después de la tinción con bromuro de etidio. La fila uno representa los marcadores de peso molecular, la segunda contiene el control positivo, después se presentan las muestras R059, R060 el medio 10B como control negativo, R061, R062, R063, R064, R065 y el segundo control negativo (H₂O estéril). Las muestras en la figura solo señala los dos últimos números de la clave.

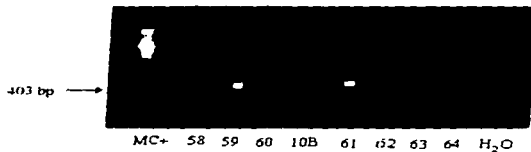
*Significa que la muestra es positiva solo por cultivo, pero no por PCR.

**Significa que la muestra es positiva solo por PCR pero no por cultivo.

En la figura 3 se analizan los productos de PCR para las muestras R058 a la R064 después de adicionar el control interno a cada una de ellas, en esta figura también se expone, que tres muestras presentan inhibidores (R062, R063 y R064), por lo cual, no es posible ver en estas muestras la banda de amplificación característica del DNA proporcionada por la fluorescencia de este con luz ultravioleta después de que el gel ha sido teñido con bromuro de etidio

Realizando una comparación entre la figura 2 y figura 3, en la muestra R064 se observa la falta de amplificación en ambos geles de agarosa.

Figura 3. Productos de amplificación por PCR a partir de muestras clínicas y presencia de un Control Interno



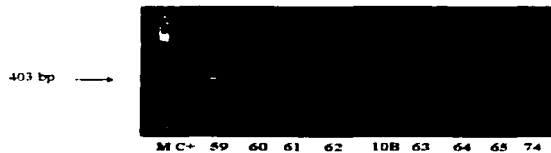
Gel de agarosa de los productos de PCR + Control Interno después de teñirse con bromuro de etidio. La primera columna (M) contiene los marcadores de peso molecular, la segunda (C+) representa el control positivo, posteriormente se determinan las muestras R058 R059, R060, control negativo usando el medio 10B (10B), las muestras R061, R062, R063, R064 y el control negativo (H₂O). En la figura solo se indican los dos últimos números de la clave de las muestras. Las muestras R062, R063 y R064 presentan inhibidores.

Las muestras R064 y R074 después de la primera PCR (en la que resultaron negativas mientras que por cultivo fueron positivas), se les realizó un previo tratamiento. Fueron incubadas en medio 10B antes de la extracción del DNA y posteriormente se realizó nuevamente PCR (figura 4). En este caso ambas muestras fueron amplificadas por medio de la reacción en cadena de la polimerasa.

En la figura 4 las muestras R059, R060, R061, R062, R063 y R065 son tomadas a partir de la muestra original. Las muestras R062 y R063 nuevamente carecieron de amplificación como se presentó en la figura 3 (amplificación de la muestra con Control Interno).

Un segundo procedimiento que se realizó en todas las muestras que presentaron inhibidores consistió en purificar el DNA por medio de cromatografía en columna, posteriormente se realizó nuevamente la PCR. Por este método se obtuvo la amplificación de DNA de *U. urealyticum* de las muestras con clave R064 y R074, además, se observó que la banda del DNA amplificado de las muestras R062 y R063 fue mas intensa (Datos no mostrados).

Figura 4. Productos de amplificación por PCR a partir de crecimiento previo en caldo 10B.



Gel de agarosa de los productos de PCR después de la tinción con bromuro de etidio. La primera columna (M) representa los marcadores de peso molecular, la siguiente (C+) representa el control positivo, posteriormente se indican las muestras R059, R060, R061, R062, control negativo (Medio 10B), muestras R063, R064, R065 y R074. En la figura solo se indican los dos últimos números de la clave las muestras.

Las muestras R064 y R074, muestran amplificación de DNA, después de haber sido tratada la muestra previamente.

Las muestras R062 y R063 no fueron amplificadas.

Se tomaron 90 muestras de aspirado traqueal de niños recién nacidos pretérmino se les determinó la frecuencia de la enfermedad causada por *Ureaplasma urealyticum* resultando 15 muestras positivas (16.6%). La frecuencia es el resultado de las muestras que fueron positivas por PCR (Ver Cuadro 1 y tabla 2), 10 de ellas fueron positivas por cultivo (11.1%) y 5 negativas, sin embargo, por el método de PCR fueron 15 muestras positivas (16.6%), es importante comentar que por este método inicialmente se presentaron 2 muestras negativas y después de una incubación previa de la muestra o de purificar el DNA se hizo posible su amplificación. De ellas 10 fueron positivas por ambos métodos. En la tabla 2 se mencionan estos valores y además la clave de la muestra.

Tabla 2. Comparación entre el método de cultivo y PCR para detectar la presencia de *U. urealyticum* en aspirado traqueal de recién nacidos pretérmino

Clave de la muestra	Dx por Cultivo	Dx por PCR
R003	Positivo	Positivo
R011	Positivo	Positivo
R021	Positivo	Positivo
R035	Positivo	Positivo
R039	Positivo	Positivo
R060	Negativo	Positivo
R061	Positivo	Positivo
R062	Negativo	Positivo
R063	Negativo	Positivo
R064	Positivo	*Negativo
R074	Positivo	*Negativo
R080	Negativo	Positivo
R085	Positivo	Positivo
R092	Negativo	Positivo
R097	Positivo	Positivo

* Muestras que inicialmente fueron negativas por PCR y después de ser tratadas resultaron positivas.

En la tabla 3 se analizan los resultados de los productos de PCR a partir de la adición del Control Interno para verificar la presencia de inhibidores en la muestra. De las 90 muestras analizadas, 20 presentaron inhibidores, 2 de ellas, fueron positivas por cultivo y negativas por PCR.

Tabla 3. Detección de la presencia de inhibidores en las muestras clínicas.

Clave de la muestra	Presencia de inhibidor	Clave de la muestra	Presencia de inhibidor	Clave de la muestra	Presencia de inhibidor	Clave de la muestra	Presencia de inhibidor
R001	Negativo	R027	Negativo	R052	Positivo	R077	Negativo
R002	Negativo	R028	Negativo	R053	Negativo	R079	Negativo
R003	Negativo	R029	Negativo	R054	Negativo	R080	Positivo
R004	Negativo	R030	Negativo	R055	Negativo	R081	Negativo
R005	Negativo	R031	Negativo	R056	Negativo	R082	Positivo
R006	Negativo	R032	Negativo	R057	Negativo	R084	Negativo
R007	Negativo	R033	Negativo	R058	Negativo	R085	Negativo
R008	Negativo	R034	Negativo	R060	Negativo	R086	Negativo
R009	Negativo	R035	Negativo	R061	Negativo	R087	Negativo
R010	Negativo	R036	Negativo	*R062	Positivo	R089	Negativo
R011	Negativo	R037	Negativo	*R063	Positivo	R090	Negativo
R012	Negativo	R039	Negativo	**R064	Positivo	R091	Negativo
R013	Negativo	R040	Positivo	R065	Positivo	R092	Negativo
R014	Negativo	R041	Negativo	R066	Positivo	R093	Negativo
R015	Negativo	R042	Positivo	R067	Positivo	R095	Negativo
R018	Negativo	R043	Negativo	R068	Positivo	R096	Negativo
R019	Negativo	R044	Positivo	R069	Negativo	R097	Negativo
R020	Negativo	R045	Positivo	R070	Positivo	R098	Negativo
R021	Negativo	R046	Negativo	R071	Positivo	R099	Negativo
R022	Negativo	R047	Negativo	R072	Positivo	R100	Negativo
R023	Negativo	R048	Negativo	*R074	Positivo	R101	Negativo
R024	Negativo	R049	Negativo	R075	Positivo		
R025	Negativo	R050	Negativo	R076	Positivo		

Resultados de PCR de las 90 muestras clínicas. En la tabla se exponen las muestras en las cuales se detectó la presencia de inhibidores por medio de PCR de la muestra más el Control Interno.

* Representa las muestras que fueron inicialmente positivas por PCR y negativas al adicionar el control interno.

** (R064 y R074) representa las muestras que fueron positivas por Cultivo pero negativas por PCR.

En el Cuadro 1 se aprecian los resultados de ambos métodos de Diagnóstico de manera más completa, en el se consideran las muestras que fueron positivas por ambos métodos (10 muestras), el número de muestras positivas por Cultivo pero negativas por PCR (0), el número de muestras positivas por PCR pero negativas por cultivo (5) y el número de muestras negativas por ambos métodos de diagnóstico (75). Tomando como referencia este cuadro se determinó que el método de PCR en comparación con el cultivo bacteriano (estandar de oro) tiene una sensibilidad del 100%, especificidad de 93.75%, potencia diagnóstica o exactitud de 94.4%, valor predictivo positivo de 66.66% y valor predictivo negativo de 100%. Este análisis se realizó posterior a la purificación del DNA en el que las muestras que fueron inicialmente negativas por PCR se hicieron positivas.

Cuadro 1. Detección de *U. urealyticum* y comparación de PCR contra cultivo por medio de una tabla de contingencia de 2X2.

		Cultivo		total
		Positivo	Negativo	
PCR	Positivo	10 A	5 B	15
	Negativo	0 C	75 D	75
total		10	80	90

En donde:

A = Verdaderos positivos
B = Falsos positivos

C = Falsos negativos
D = Verdaderos negativos

Cálculos para determinar la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y exactitud

- **Sensibilidad** = $\frac{10}{10 + 0} = 100\%$
- **Especificidad** = $\frac{75}{5 + 75} = 93.75\%$
- **VP+** = $\frac{10}{5 + 10} = 66.66\%$
- **VP-** = $\frac{75}{75 + 0} = 100\%$
- **Potencia Diagnóstica o exactitud** = $\frac{10 + 75}{90} = 94.4\%$

En el cuadro 2, se realizó con la finalidad de comparar la sensibilidad, especificidad y potencia diagnóstica del método de cultivo contra PCR, en el se consideran las muestras que fueron positivas por ambos métodos (10 muestras), el número de muestras positivas por PCR pero negativas por Cultivo (5), el número de muestras positivas cultivo por pero negativas por PCR (0) y el número de muestras negativas por ambos métodos de diagnóstico (75). Tomando como referencia este cuadro se determinó que el método de cultivo en comparación con PCR tiene una sensibilidad del 66.66%, especificidad de 100%, potencia diagnóstica o exactitud de 94.4%, valor predictivo positivo de 100% y valor predictivo negativo de 93.75%.

Cuadro 2. Detección de *U. urealyticum* y comparación de cultivo contra PCR por medio de una tabla de contingencia de 2x2.

		PCR		total
		Positivo	Negativo	
Cultivo	Positivo	10 A	0 B	10
	Negativo	5 C	75 D	80
total		15	75	90

Cálculos:

- **Sensibilidad** = $\frac{10}{10 + 5} = 66.66\%$
- **Especificidad** = $\frac{75}{0 + 75} = 100\%$
- **VP+** = $\frac{10}{0 + 10} = 100\%$
- **VP-** = $\frac{75}{75 + 5} = 93.75\%$
- **Potencia Diagnóstica o exactitud** = $\frac{10 + 75}{90} = 94.4\%$

Las 90 muestras totales de aspirado traqueal de los niños recién nacidos pretermino, fueron divididas para su estudio en tres diferentes grupos. El primero fue conforme a la edad, el segundo conforme al sexo y el tercero conforme a el peso

Edad:

Con respecto a la edad, en los primeros tres días después del nacimiento se observa mayor número de niños con enfermedad respiratoria. *U. urealyticum* también se determina con mayor frecuencia para esta edad. Sin embargo, la edad en la cual se presenta con mayor frecuencia *U. urealyticum* como factor en la infección respiratoria, es en el 1er día, posteriormente puede notarse como la presencia de este microorganismo descendi conforme aumenta la edad. (tabla 5)

Tabla 5. Muestras positivas para U. urealyticum, comparación entre el método de diagnóstico y su distribución conforme a la edad.

Edad (días)	n	Positivos totales U.u (%)	Positivos Cultivo U.u	Positivos PCR U.u
1	45	6 (6.6)	5	6
2	15	4 (4.4)	1	4
3	14	2 (2.2)	1	2
4	3	0	0	0
5	1	0	0	0
6	1	1 (1.1)	1	1
7	3	0	0	0
Sin Datos	8	2 (2.2)	2	2

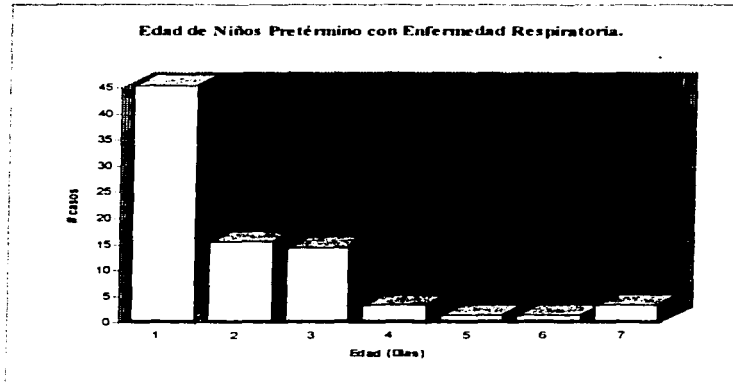
$$\bar{X}_{t,dad} = 1.96 \text{ días}$$

La tabla anterior muestra el número de casos positivos para *U. urealyticum* (U. u.) conforme a la edad y compara los dos tipos de diagnóstico utilizados en este estudio (Cultivo y PCR). El número que se encuentra entre paréntesis representa el porcentaje total de aislamiento (es decir las que fueron positivas por Cultivo y/o PCR) para cada rango de edad.

A cada valor se realizaron cálculos para P con base en χ^2 y Fisher, sin embargo, en todos los casos P fue > 0.05, excepto el número de casos positivos para el 1er día de edad comparado con el 6to día de edad ($\chi^2 = 5.70$ P=0.017).

A continuación se presenta en forma gráfica los resultados de la tabla 5

Figura 5



Se muestra el número de muestras y su distribución conforme a la edad de los niños con enfermedad respiratoria. La edad que presenta mayor número de casos es en el 1^{er} día de nacidos

Figura 6.

Edad de niños recién nacidos pretérmino con enfermedad respiratoria y comparación entre el diagnóstico para *U. urealyticum*.

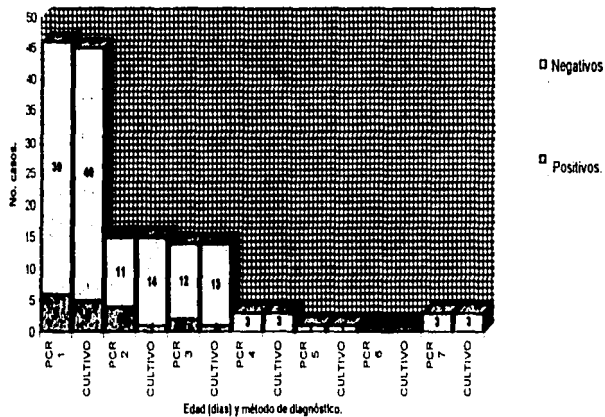


Figura 6 Muestra la edad de los niños recién nacidos con enfermedad respiratoria y presencia de *U. urealyticum*. La parte oscura de la gráfica representa los casos negativos, mientras que la parte clara de la gráfica representa el número de casos positivos. En el eje de las X se presenta la edad en días y el tipo de diagnóstico, en el eje de las Y se representa el número de casos para cada valor respectivamente.

Sexo.

Con respecto al sexo de las 90 muestras totales, 48 de ellas corresponden al sexo masculino y 36 al sexo femenino, en el caso de los niños, el número de positivos totales para *Ureaplasma* fueron 7 y las niñas positivas para *Ureaplasma* también fueron 7. Por el método de PCR para los niños se identificaron 3 muestras positivas que por cultivo fueron negativas, mientras que para las niñas se identificaron 2 muestras positivas por PCR que por cultivo fueron negativas, con lo cual la suma da como total las cinco muestras negativas por Cultivo y PCR positivas. En los datos sin valor se presenta una muestra positiva por cultivo y PCR.

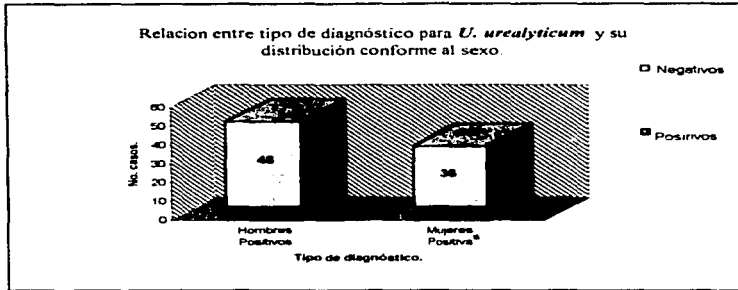
Tabla 6. Comparación entre el método de diagnóstico para determinar *U. urealyticum* y la influencia del sexo.

Sexo	n	Total	Cultivo Positivos	PCR Positivos
			U.m	P.
Masculino	48	7	4	7
Femenino	36	7	5	7
G	6	1	1	1

$\chi^2 = 0.25 \quad P > 0.05$

Representa el número total de muestras y se dividen conforme al sexo. La primera columna presenta el número total de positivos para *U. urealyticum* determinados por cultivo y/o PCR. Posteriormente se presenta el número de muestras positivas para *Ureaplasma urealyticum* por la técnica de cultivo y por último se muestra el número de muestras positivas por PCR

Figura 7



Muestra el numero de casos positivos y negativos para *U. urealyticum* y su distribución conforme al sexo.

Peso:

En la tabla 7 se analiza el peso (en gramos) de las 90 muestras de aspirado traqueal de los niños recién nacidos pretérmino con enfermedad respiratoria, tomando en cuenta el dato del paciente con menor peso y el del paciente con mayor peso, el análisis se dividió en diez rangos. Como puede observarse en este caso, entre menor es el peso mayor es el número de aislamiento de *Ureaplasma*. Entre 700 a 1555g se determinaron 12 muestras positivas por el método de PCR y/o Cultivo, mientras que en el rango de 1556 a 3550g solo se determinaron 2 muestras positivas. La frecuencia de los niños con enfermedad respiratoria también es mayor cuando el paciente presenta menor peso y esta frecuencia disminuye conforme aumenta el peso del infante.

Cuando se realizaron cálculos para P con base en χ^2 en cada uno de los datos, de manera independiente no existe diferencia estadísticamente significativa entre ellos, sin embargo, cuando se dividen estos diez rangos en dos grupos, el primero que corresponde a los menores de 1555g y el segundo que corresponde a los mayores de este peso, el valor de P < de 0.05 como se muestra en la tabla.

Con respecto a la comparación entre ambos métodos de diagnóstico, de 700 a 985g. por cultivo se determinaron 2 de las cuatro muestras positivas totales para *Ureaplasma*, y por PCR se detectaron las 4 muestras, entre 986 a 1270g por cultivo se detectaron 3 y por PCR 4, entre 1271 a 1555g por cultivo se detectaron 2 de 4 muestras positivas totales y por PCR 4 de ellas, entre 1556 a 1840g por ambos métodos se detectó 1 muestra positiva al igual que entre 2411 a 2696g. En los valores que carecen de datos solo se detectó 1 muestra positiva por ambos métodos.

Tabla 7. Comparación entre el método de cultivo y PCR conforme al peso en gramos.

Peso	n	Positivos Totales U. _m	Positivos Cultivo U. _m	Positivos PCR U. _m
700-985	16	2	2	4
986-1270	14	4	3	4
1271-1555	21	4	2	4
1556-1840	14	1	1	1
1841-2125	5	0	0	0
2126-2410	7	0	0	0
2411-2696	6	1	1	1
2697-2980	1	0	0	0
2981-3265	0	0	0	0
3266-3550	1	0	0	0
Sin Datos	5	1	1	1

$$X^2 = 4.5 \quad P = 0.031 < 0.05 \quad \bar{X}_{total} = 1530.5 \text{ g}$$

Representa el número total de muestras y se dividen conforme al peso. Posteriormente se presenta el total de positivos para *U. urealyticum* determinados por cultivo y/o PCR, posteriormente el número de muestras en que se encontró *Ureaplasma urealyticum* por la técnica de cultivo, y por último, las muestras positivas por el método de PCR.

El cálculo para P a partir de X^2 se realizó dividiendo al peso en dos grupos diferentes de 700-1555 g y de 1556-3550 g.

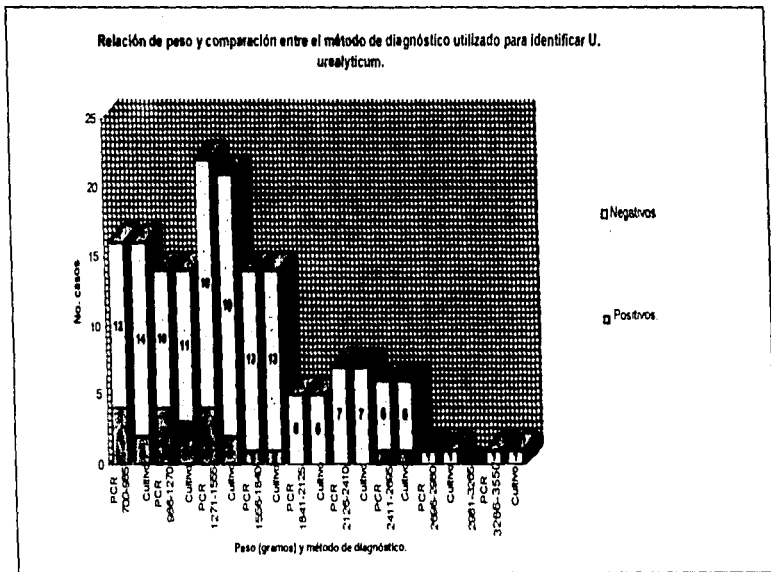


Figura 8. Muestra el número de casos de niños recién nacidos pretérmino con enfermedad respiratoria, el número de casos positivos para *U. urealyticum* y negativos, compara de forma gráfica los dos métodos de diagnóstico empleados y la distribución de cada una de estas variables conforme al peso en gramos.

DISCUSION DE RESULTADOS.

En países latinoamericanos en vías de desarrollo la incidencia de nacimientos prematuros más baja se reporta en Colombia (que presenta un 8%), y la más alta se registra en Guatemala (que presenta un 20%). En México, algunos autores reportan una incidencia del 12% , pero existen valores tan altos que alcanzan hasta el 30%⁽¹²⁾

En estudios realizados en E.U. de América por la Dra Cassell⁽¹³⁾ el aislamiento de *Ureaplasma urealyticum* en niños prematuros varía del 14 al 17%, estos estudios se han realizado por cultivo y algunos por PCR utilizando los genes de la ureasa. En México existen dos estudios realizados por la Dra Castillo, en el primero se encuentra una frecuencia de aislamiento del 11%, este estudio incluye 82 niños entre 0 y 12 meses de edad, de los cuales se aisló *U. urealyticum* en 9 casos, sin embargo, si se considera únicamente el grupo de neonatos se obtiene una frecuencia de aislamiento del 13%. Se observa también que el 55% de los cuadros clínicos se iniciaron en la primera semana de vida y solamente el 33% después del primer mes de edad⁽¹⁴⁾. Otro estudio que incluye a 100 recién nacidos con enfermedad respiratoria demuestra la presencia de *Ureaplasma urealyticum* en un 13%⁽¹⁵⁾. Ambos trabajos se realizaron utilizando el método de cultivo. Hasta ahora en México no se han reportado estudios en niños recién nacidos pretermino con enfermedad respiratoria que presenten las características de edad planteadas en este estudio. Si comparamos estos resultados con los obtenidos en el presente estudio, de 15 muestras positivas totales (16.66%), 15 fueron positivas para *Ureaplasma urealyticum* mediante la prueba de PCR (16.66%), sin embargo por cultivo sólo se lograron identificar 10 muestras positivas (11.1%). Estos datos son muy similares a los reportados en los estudios realizados por la Dra Cassell, en los que utilizó el diagnóstico por medio de cultivo y PCR en donde se encontró la frecuencia de aislamiento del 17%. Si comparamos con respecto a los trabajos realizados por la Dra Castillo el aumento de la incidencia de aislamiento presente en este estudio se debe a que el diagnóstico fue realizado por cultivo y PCR, mientras que los otros estudios solo se realizaron por cultivo.

En el diagnóstico por cultivo algunas muestras se consideraron como dudosas (datos no mostrados en los resultados), debido a que presentaban un cambio de color en caldo 10B, sin que se encontraran otros microorganismos productores de ureasa, o incluso sin encontrarse ningún microorganismo. Sin embargo, no se observaron colonias en el Agar A8. Algunas veces al filtrar el medio y volver a sembrar no se volvía a presentar cambio de color ni tampoco se observaban las colonias en agar A8. En este dato existe controversia, algunos autores comentan que *Ureaplasma* crece mejor en medio líquido y que es conveniente realizar un cultivo previo en este medio y una vez obtenido el crecimiento, sembrar en Agar. Otros comentan que existe mejor desarrollo en Agar que en medio líquido. La baja positividad por el método de cultivo se atribuye, aunque en parte mínima, a la dificultad para reconocer las colonias de *Ureaplasma*. Otra de las causas que pueden influir con la deficiencia del cultivo son los efectos ambientales no

controlados, como por ejemplo, la temperatura entre la toma de muestra y el comienzo de su procesamiento, la forma en que se toma la muestra (aspirados traqueales) y los efectos de otros microorganismos. El papel de otros microorganismos sobre el crecimiento de *U. urealyticum* puede ser la competencia por los requerimientos nutricionales presentes en el medio

Los factores anteriores no influyen en el diagnóstico por PCR en donde lo que importa es que el DNA de *Ureaplasma* esté presente y no importa si la bacteria está viva o muerta, además la presencia de otros gérmenes diferentes de *U. urealyticum* no influyen en el diagnóstico, puesto que los primers del antígeno multibandeado, no los distingue, es decir son altamente específicos

Además se aislaron 10 microorganismos distintos de *Ureaplasma urealyticum*. (Tabla 1) incluyendo diferentes especies de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Levaduras* (entre ellas *Candida albicans*), *Pseudomonas* y *Difteroides*, estos fueron los cinco que se aislaron con mayor frecuencia. Bajo las características de estos pacientes *Ureaplasma* es la bacteria que se aísla en un mayor número de casos, posiblemente porque ésta es capaz de colonizar al producto desde el útero materno o en el canal de parto a diferencia de los otros microorganismos que pudieron colonizar al neonato al momento del nacimiento por vía transvaginal o por el ambiente hospitalario, y como este paciente recién nacido se encuentra en estado inmunocomprometido y además la intubación favorece al desarrollo de infecciones por los microorganismos antes mencionados. Es importante resaltar que *Ureaplasma urealyticum* se encontró asociado en 4 ocasiones junto con otras bacterias (4.4%) causando infecciones mixtas, por lo tanto, pudiera ser que la infección en estos neonatos no solo se debe a la presencia de este microorganismo. Por este motivo se sugiere que al solicitar la búsqueda de *Ureaplasma*, ya sea utilizando el método de cultivo o PCR, se realice el cultivo para otras bacterias, sobre todo si se emplea el método de PCR y se utilizan los primers UMS-125 y UMA-226 de la secuencia del gen del antígeno multibandeado, que ha demostrado que es específico y por lo tanto, considerar que la infección puede ser mixta para dar el tratamiento adecuado. (3, 4, 18)

Con respecto al diagnóstico con PCR existen tres posibles factores que pudieran explicar porqué *Ureaplasma* no fue identificada inicialmente en dos muestras por este método siendo que por cultivo fueron positivas. Los factores son:

1. La presencia de componentes inhibitorios en la muestra los cuales forman parte importante en el ensayo de la PCR.
2. la concentración escasa del DNA de la bacteria presente en la muestra originando que por PCR no pueda ser detectado.
3. Existe un tercer factor que pudiese influir en la determinación por PCR, aunque con respecto a este no existen publicaciones, esto es la influencia de otros microorganismos al encontrarse junto con *Ureaplasma*. En ambas muestras negativas por PCR existe la asociación con otro género, (Ver tabla 1).

Para saber más acerca de los puntos 1 y 2 fue necesario comparar la PCR de las muestras originales, y la PCR con *Control Interno* en donde se observó que en ambas muestras existía presencia de inhibidores (las muestras que presentaron este problema fueron la R064 y R074 - Ver figuras y tablas 2 y 3)

Además de correr la PCR con *Control Interno*, a partir de las muestras originales que se tenían en refrigeración, se sembraron e incubaron en caldo 10B, una vez que se observó crecimiento se extrajo el DNA y nuevamente se realizó PCR. En esta ocasión ambas muestras fueron amplificadas y la PCR fue positiva para ambas muestras (Ver figura 4) Estos resultados sugieren que probablemente la baja concentración de DNA en las muestras originales unida a la presencia de inhibidores origina que por el método de PCR no sea posible detectar el DNA de *Ureaplasma urealyticum*. El crecimiento previo en caldo se realizó con la finalidad de aumentar la concentración del DNA de *U. urealyticum* presente en la muestra y disminuir la concentración de inhibidores.⁽⁴⁾

Con el método de cultivo se realizan diluciones para reducir la concentración de inhibidores de la muestra original, si es que están presentes en esta, por esta causa es posible que las muestras fueron positivas por cultivo y negativas por PCR. Lo anterior sugiere, que además de esperar crecimiento de *U. urealyticum* en caldo 10B en muestras que presentaron inhibidores se debió realizar PCR tomando solo 1 µl del templado en lugar de 5 µl que se tomaron originalmente, con la finalidad de diluir más los inhibidores presentes. En algunos estudios este procedimiento ha dado buenos resultados.⁽⁴⁾

Otra forma de eliminar los inhibidores, una vez detectada su presencia en la muestra es adicionar más cantidad de proteinasa K, en las muestras donde ya se había extraído el DNA. Este procedimiento también ha dado buenos resultados y además sugiere que los inhibidores son de naturaleza peptídica. Sin embargo, se debe seguir buscando un método que desde el principio elimine los efectos de los inhibidores.

Parece ser que la purificación del DNA por medio de cromatografía en columna es un método rápido y prometedor, con este método fue posible la amplificación de las 2 muestras que no fueron amplificadas inicialmente por PCR, pero que fueron positivas por cultivo (R064 y R074), además, algunas muestras que fueron positivas inicialmente por PCR, pero que mostraban una banda de ligera intensidad y presencia de inhibidores, después de la purificación, fue posible apreciar las bandas más intensas en las muestras R062 y R063 (Datos no mostrados)

Con los resultados anteriores se puede eliminar la posibilidad de que la presencia de otros microorganismos o la baja concentración de DNA de *U. urealyticum* en la muestra sean los responsables de la falta de amplificación por PCR. Se elimina la posibilidad de que la baja concentración del DNA tenga un papel significativo, porque, fue posible la amplificación sólo con la purificación, es decir, sin la necesidad de aumentar el número de microorganismos y por consecuencia del DNA. Por lo tanto la explicación más favorable es la influencia de factores inhibidores.

Debido a que en el corrimiento de PCR de las muestras R059-R065 (Figura 2) fue en donde se presentaron 3 muestras positivas por este método, siendo que por cultivo fueron negativas en un principio se sospecho de "carry over", es decir, acarreamiento del DNA a partir de las muestras positivas, por este motivo la PCR se realizó dos veces más, en estas dos corridas se obtuvieron los mismos resultados, por lo tanto, la repetición de la PCR tubo como objetivo verificar que los resultados fueran realmente los obtenidos y con esto, descartar la posibilidad de que las muestras R060, R062 y R063 fueran producto de contaminación. Posteriormente en las figuras 3 y 4 ya no se detecto la amplificación de las muestras R062 y R063, quizá se debe a la poca cantidad de DNA en esas muestras y la presencia de inhibidores, otro factor que pudo haber influido fue el constante descongelamiento y congelamiento de esas muestras para la verificación de los resultados (degradación del DNA presente en la muestra). En este estudio, el corrimiento de la PCR a partir de las muestras originales y el corrimiento con el control interno se realizó a diferentes tiempos. Por lo anteriormente mencionado, se recomienda realizar simultáneamente los dos corrimientos de PCR (corrimiento con la muestra original y el corrimiento con Control Interno) para conservar las mismas características, la misma concentración del DNA y evitar este tipo de confusiones.

Como se muestra en el cuadro 1 los resultados para el metodo de PCR (sensibilidad, especificidad, y exactitud) proporcionaron resultados favorables y estan de acuerdo a lo planteado en la hipotesis, por lo cual el metodo puede ser usado como alternativo en el Diagnóstico de *Ureaplasma urealyticum*. En el caso del valor predictivo positivo (VP⁺) este es un poco bajo (66.66%), sin embargo, puede estar originado en que este valor al igual que el valor predictivo negativo (VP⁻) son influenciados por la frecuencia. En el caso del (VP⁻) disminuye el valor cuando la frecuencia aumenta.

En los niños incluidos en este estudio (prematuros, con muy bajo peso al nacer y presencia de enfermedad respiratoria), el organismo no solo es capaz de producir la enfermedad, sino que además, por consecuencia de este puede causar la muerte del neonato, por lo que el diagnóstico rápido es aun de mayor importancia y la gravedad e incidencia de los casos justifica el diagnóstico por PCR en cuanto a su realización y a su costo, ya que ha demostrado ser un buen metodo. Un punto importante en el diagnóstico por PCR es que el tiempo se reduce de 2 a 15 días por el cultivo a 1 día por PCR y además de ser rápido es específico (solo reconoce a esta especie) ⁽²⁸⁾

Otra ventaja que presenta este metodo de PCR usando como primer los genes del antígeno multibandeado, es que no se requiere de una previa incubación de la muestra en el medio 10B de 12 a 18 horas, como se realiza para la PCR que usa como primer los genes de la ureasa, además este clasifica correctamente a los serotipos en el biovar correspondiente, lo cual no es así con los genes de la ureasa que clasifica a los serotipos 10 y 12 dentro del biovar 1, cuando en realidad corresponden al biovar 2, ^(4, 26, 30) otra ventaja que presenta si se compara con la PCR que utiliza el gene 16S rRNA es que este gene se relaciona íntimamente con *Mycoplasma pneumoniae*, este problema no se presenta en el caso de la PCR utilizada en este trabajo debido a la especificidad del Antígeno multibandeado y por lo tanto se evita la reacción cruzada. ⁽²⁸⁾

Posteriormente las muestras fueron estudiadas conforme a la edad, al sexo y al peso. Los valores para estas características se presentan conforme a lo esperado, esto es, a menor edad y peso se aísla con mayor frecuencia *U. urealyticum*, estos datos ya se habían observado en otros estudios realizados en Birmingham Alabama por la Dra Cassell en niños prematuros (de 34 a 37 semanas de gestación) y con peso <math>< 1000\text{g}</math>, en donde no sólo son los más probables de estar colonizados, sino que también son los más propensos a desarrollar CLD de la prematuridad y de morir.⁽¹³⁾ En México en el estudio realizado por la Dra Castillo⁽¹⁴⁾ se observa que el inicio de la infección es mayor en la primera semana de vida, y la prematuridad y el bajo peso son las principales características de los niños en los que se aisló *Ureaplasma urealyticum*. En este estudio se observa lo mismo incluso esta frecuencia de aislamiento es mayor que la que se observa en otros microorganismos (Tabla 5), la edad que presenta mayor frecuencia de aislamiento es en el 1er día de vida (6 positivos), después a los 2 días de vida (4 positivos), sin embargo, para poder decir que realmente se presenta este fenómeno se propone que posteriormente se estudie una población que incluya el mismo número de pacientes para cada uno de los rangos de edad, esto mismo sucede en el caso de la comparación del peso y del sexo. Un factor que pudo haber influido aunque mínimamente en las observaciones, es que en algunos pacientes no se registró la edad, el sexo y el peso por causas desconocidas. Con estos datos sólo se presentó diferencia estadísticamente significativa comparando el 1er día de edad y el 6to día de edad.

Con respecto al sexo, no se observa que predominen alguno de ellos, (Tabla 6) ni en el caso de la frecuencia de aislamiento de *U. urealyticum* ni en el número de niños con enfermedad respiratoria con o sin presencia de *Ureaplasma*, en ambos casos la frecuencia de aislamiento es muy similar, aunque en este caso también puede influir que 6 muestras no presentan datos.

Por último en el caso del peso, parece ser que *U. urealyticum* se presenta con mayor frecuencia en niños con peso menor de 1555g, que en los mayores de este y está de acuerdo con que *U. urealyticum* se asocia con el bajo peso al nacer y la prematuridad.^(13, 16) (Tabla 7). Algunos niños presentaron peso mayor de 2,500 g, éste podría parecer de niño de término, sin embargo de acuerdo a una gráfica para relacionar el peso con la edad gestacional a las 34 semanas los pequeños para esta edad pesan 1500g y los grandes pesan 2750g. Existe un niño mayor de este peso (3555g) sin embargo habría que considerar otros factores en la madre, tales como la presencia de alguna enfermedad (Como por ejemplo diabetes) que pudiera influir para que el bebé este aumentado de peso aún cuando es prematuro.

El presente, estudio deja abierta la investigación de *Ureaplasma urealyticum*, sobre todo en México, en donde los estudios para este microorganismo son escasos, además de la pauta a futuras investigaciones para conocer más sobre las propiedades del antígeno multibandeado, para que pueda ser usado en el diagnóstico, y para conocer el papel que juega éste en la infección causada por *Ureaplasma urealyticum*.

CONCLUSIONES.

- La frecuencia de infección causada por *Ureaplasma urealyticum* fue de 16.66%
- Es el microorganismo más comúnmente aislado en niños pretérmino (de 23 a 34 semanas de gestación, peso mayor o igual a 550g), enfermedad respiratoria.
- La sensibilidad del diagnóstico por PCR es igual al 100%. La especificidad del método de PCR es de 93.75% y la potencia diagnóstica del método de PCR es del 94.4%. Por lo tanto se concluye que la PCR puede ser usada como método alternativo de diagnóstico.
- PCR es un método rápido, sensible, específico y el costo puede ser justificado por la demanda en el número de muestras solicitadas.
- En los centros de referencia el método de PCR puede ser el de elección.
- La infección causada por *U. urealyticum* parece que no presenta diferencia estadísticamente significativa al relacionar los valores para el sexo.
- Presentó mayor frecuencia de aislamiento en niños de menor edad y con peso menor de 1555g.
- La infección en el tracto respiratorio de recién nacidos pretérmino puede ser causada no solo por la presencia de *Ureaplasma urealyticum* sino que puede estar asociada con otros microorganismos.
- Se deben considerar las infecciones mixtas.

ANEXO.

• **PREPARACION DE REACTIVOS:**

NOTA. Todas las preparaciones se realizan en condiciones asépticas.

• **STUART**

El medio de transporte Stuart consta esencialmente de una solución de amortiguadores (soluciones estabilizadoras de pH) con exclusión de hidratos de carbono, peptonas y otros nutrientes. Este medio está concebido para preservar la viabilidad de las bacterias durante el transporte sin multiplicación significativa de los microorganismos. El tioglicolato de sodio se añade como agente reductor para mejorar la recuperación de bacterias anaerobias, y la pequeña cantidad de agar provee una consistencia semisólida para impedir oxigenación y derramamiento durante el transporte (10).

a) Composición.

Tioglicolato de sodio	1.0 g
Glicerofosfato de sodio	10.0 g
Cloruro de calcio	0.1 g
Azul de metileno	0.002 g
Agar	3.0 g
Agua desmineralizada	1.0 L

b) Preparación:

- Pesar 14.1 g de polvo
- Disolver en 1 L de agua desionizada
- Hervir por 1 minuto
- Vaciar 7 ml de medio en tubos de 15 cm
- Esterilizar por 15 min a 121°C
- Enfriar y almacenar en refrigeración.

• **MEDIO 10 B:**

PROPOSITO: El medio 10 B es un medio de enriquecimiento en caldo usado para el cultivo de *Ureaplasma urealyticum* y otros *Mycoplasmas* genitales.

PRINCIPIO E INTERPRETACION: Este medio contiene Urea al 10% que *Ureaplasma urealyticum* metaboliza y produce Amonio incrementando el pH y originando un cambio de color en el medio de amarillo a rosa (de ácido a básico), por el indicador rojo de fenol al 1%. Se adiciona arginina, si se desea aislar *Mycoplasma hominis*, que además del cambio de color crece con ligera turbidez.

a) Composición: (para preparar 1 L)

BASE:

Caldo base para Mycoplasma	14 g
DNA (sigma)	0.2 g
Agua destilada	800 ml
Rojo de fenol(1%)	0.1 ml

- Ajustar pH a 5.5 con ácido clorhídrico
- Esterilizar por 30 min. Enfriar a temperatura ambiente.

SUPLEMENTO

Suero fetal bovino inactivo a 56°C y filtrado (0.22 µ) 200 ml
Cisteína al 4% (fresca y filtrada en 0.22 µ) 2.5 ml
Isovitalex 5.0 ml
Urea ultrapura al 10 % 4.0 ml
Cefobid 250 µl

b) Preparación:

- Adicionar en condiciones de esterilidad el suplemento a la base.
- Mezclar
- Ajustar el pH final de 6.0 a 6.1
- Realizar alícuotas de 0.9 ml
- Almacenar en refrigeración a 4°C

(NOTA.: Este medio es el mismo utilizado para transporte y cultivo).

• **AGAR A 8:**

PROPOSITO: El Agar A 8 es un medio diferencial utilizado para el aislamiento de Mycoplasmas.

PRINCIPIO E INTERPRETACION: El enriquecimiento tal como el suero de caballo, extracto de levadura y urea son incluidos en este medio para mejorar la diferenciación de *U. urealyticum* de los organismos no- hidrolíticos de urea como los *Mycoplasmas*. Las colonias de *U. urealyticum* aparecerán café o negras sobre el medio con cloruro de calcio debido a la producción de ureasa en presencia de cloruro de calcio como indicador. Las colonias de Mycoplasmas son aisladas en A 8 pero son ureasa negativas y tienen la típica apariencia de "huevo frito".

a) Composición: Para preparar 1 L.

BASE.

Agua destilada	825 ml
Cloruro de calcio	0.15 g.
Caldo Soya Tripticasa	24 g
Extracto de levadura	2 g
Putrecina di-HCL	1.7 g
DNA	0.2 g
Agar exento de inhibidores	10.5 g

- Mezclar
- Ajustar el pH a 5.5 con HCl 2 N
- Esterilizar por 30 min 121° C
- Enfriar en un baño de agua a 56 °C

SUPLEMENTO

Suero de caballo	200 ml
CVA Enriquecimiento	5 ml
Solución Stock de Urea al 10%	10 ml
Solución de Cisteína al 10%	15 ml
GHL solución tripeptido	1 ml
Cefobid	0.2 ml.

b)Preparación:

- Adicionar el suplemento a el agar base
- Vaciar a las placas
- Dejar enfriar
- Invertir las placas después de 1 hora
- Refrigerar a 4° C.

• **AGAR DE MACCONKEY (Bioxon)**

a) Composición: Para 1000 mL de agua destilada:

Peptona de caseína.....	1.500 g
Peptona de gelatina	17.000 g
Peptona de carne	1.500 g
Lactosa	10.000 g
Sales biliares	1.500 g
Cloruro de sodio.....	5.000 g
Agar	13.500 g
Rojo neutro	0.030 g
Cristal violeta.....	0.001 g

b) Preparación:

- Suspender 50 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada.
- Mezclar bien hasta que se obtenga una suspensión uniforme.
- Dejar reposar de 10 a 15 min
- Calentar suavemente agitando frecuentemente y hervir durante 1 min.
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

• **AGAR DE MUELLER-HINTON (Bioxon)**

a) Composición. Para 1000 mL de agua destilada.

Infusión de Carne de res	300.0 g
Peptona de caseína H.....	17.0 g
Almidón.....	1.5 g
Agar	17.0 g

pH final +/- 7.4

b) Preparación:

- Suspender 38 g del polvo en un litro de agua destilada.
- Mezclar bien calentando y agitando frecuentemente.
- Hiérvese alrededor de un minuto.
- Se distribuye y esteriliza en autoclave de 116°C a 121°C durante no más de 15 min.
- Enfríese a 45°C ó 50°C .

No se sobrecaliente en ningún momento. Al refundir el medio frío caliéntese lo más breve que se pueda

• **GELOSA SANGRE**

a) Composición. Para 1000 mL de agua destilada

Extracto de levadura	5.0 g
Infusión de músculo cardíaco (sólidos)	2.0 g
Peptona de Caseína	13.0 g
Cloruro de Sodio	5.0 g
Agar	15.0 g

pH final 7.3 +/- 0.2

b) Preparación:

- Suspender 40 g del polvo en un litro de agua destilada.
- Mezclar perfectamente, calentar con agitación frecuentemente.
- Hervir durante un minuto hasta disolución completa.
- Distribuir y esterilizar a 121°C por 15 min.
- Enfriar la base a 45° C y adicionar 5% de sangre esteril desfibrinada.
- Adicionar el antibiótico en caso dado Ampicilina previamente reconstituida en solución Salina isotónica (SSI) esteril.

• **AGAR GELOSA CHOCOLATE (Bioxon)**

a) Composición: Para un litro de agua destilada

Peptona de cascina	7.5 g
Peptona de carne	7.5 g
Almidón de maíz	1.0 g
Fosfato dipotásico	4.0 g
Fosfato monopotásico	1.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar	10.0 g
Hemoglobina (Bioxon)	10.0 g

pH final 7.2 +/- 0.2

b) Preparación:

- En un matraz disolver 10 g de la base de hemoglobina en 500 mL de agua destilada sin calentamiento.
- En otro matraz disolver 36 g de la base de agar gelosa chocolate en 500 ml de agua destilada. Agitar bien y dejar en reposo durante 10 a 15 min.
- Esterilizar por separado a 121°C por 15 min.
- Enfriar ambas soluciones a 50°C (si se usa baño de agua mejor)
- Agregar cuidadosamente la solución de hemoglobina a la base de gelosa chocolate y mezclar bien sin que se formen burbujas.
- Distribuir en cajas petri

• **ROJO DE FENOL:**

a) Composición

Rojo de fenol 10.0 g
NaOH 1 N 30 ml
Agua destilada aforar a 1000 ml

b) Preparación

- Depositar el Rojo de fenol en un matraz de 1000 ml
- Agregar 570 ml de agua destilada
- Agregar 30 ml de la solución de NaOH 1 N.
- Agitar por 2 horas a temperatura ambiente
- Aforar a 1 litro con agua destilada.
- Filtrar con papel Whatman número 3.
- Esterilizar en autoclave a 110° C durante 10 minutos.
- Conservar durante un mes a temperatura ambiente y en obscuridad.
- Descartar si existe precipitado

• **UREA AL 10%:**

a) Composición:

Urea 20 g
Di-H₂O (Milli Q)..... 200ml

- Adicionar la urea al agua
- Agitar hasta disolver
- Filtrar
- Esterilizar.
- Espiración: 6 meses

• **CISTEINA 2 y 4 %**

- Pesar la cisteina correspondiente
- Disolver en agua
- Filtrar por medio de membrana 0.22µm
- La solución se prepara el mismo día de su uso

• **PROTEINASA K:**

1. **SOLUCION A:**

Tris HCl (pH=8.0 1M)	1 ml
K Cl (1M)	10 ml
MgCl ₂	0.25 ml
H ₂ O Milli Q	88.75 ml

- Mezclar
- Esterilizar
- Almacenar a temperatura ambiente.

2. **SOLUCION B:**

Tris HCl (pH=8 1M)	1 ml
MgCl ₂	0.25 ml
Triton X-100	01 ml
Tween 20	1 ml
H ₂ O- Milli Q	96.75ml

- Mezclar
- Esterilizar
- Almacenar a temperatura ambiente.

3. **PROTEINASA K:**

Proteinasa K	100 mg
Milli-Q-diH ₂ O	5 ml

La concentración de esta solución es 20 mg/ml.

4. AMORTIGUADOR DE LISIS PROTEINASA K SOLUCION A+B:

Proteinasa K solución 1 ml
Solución B 19 ml
Solución A 20 ml

- Adicionar 1 ml de proteinasa K a 19 ml de solución B
- Mezclar
- Adicionar la solución A
- Mezclar
- Realizar alicuotas de 1.5 ml A+B proteinasa K en criotubos de 2 ml.
- Almacenar a -70°C.

• **GELATINA 10X:**

Gelatina 0.1 g
Agua desionizada estéril 99.9 ml

- Mezclar
- Realizar alicuotas de 1.5 ml en criotubo de 2 ml
- Almacenar a temperatura ambiente

• **AMORTIGUADOR PCR 10X:**

Tris H Cl (pH=8.0 100 mM) 1 ml
K Cl (500 mM) 5 ml
MgCl₂ (17.5 mM) 150 µl
Agua desionizada estéril 3.85 ml

- Mezclar
- Almacenar a -70°C.

• **KCLIM:**

K Cl 74.56 g
Agua desionizada estéril 1000 ml

- Mezclar
- Alicuotar

- Almacenar a temperatura ambiente.

- **MgCl₂ 1M:**

MgCl₂..... 203.3 g
Agua desionizada estéril 1000 ml

- Mezclar
- Alicuotar
- Almacenar a temperatura ambiente.

- **Tris HCl:**

(1 M, pH=8.0, 8.3 y 8.5)

Trisma base 121.1 g
Agua desionizada 1000 ml

- Disolver el trisma base en 700 ml de agua desionizada
- Ajustar pH con ácido clorhídrico concentrado
- Esterilizar

Nota: el pH del amortiguador depende de la temperatura.

- **PRIMERS:** (40 µM)

Primer 1: -125 (Número de bases 26, 163.52 µM)

Oligo stock 73.39 µl
Agua desionizada estéril 226.61 µl

Primer 2: -226 (Número de bases 28, 131.60 µM)

Oligo stock 91.18 µl
Agua desionizada estéril 208.82 µl

- Almacenar a -70°C.

- **AMPLI-TAQ:**

5 U/µl Ampli taq

- Almacenar a -20°C

• **AGAROSA:**

Agarosa.....	3 g
TBE 1X.....	150 ml

- Agitar
- Disolver en Horno de microondas por 3 minutos
- Esperar que enfíe un poco aproximadamente 10 min
- Vaciar en la cámara
- Esperar 30 minutos antes de cargarse

Nota: Cuidar que no se derrame en el horno de microondas, al hervir provoca abundante espuma.

• **TBE SOLUCION STOCK 10X:**

Trisma base.....	60.5 g
Acido Bórico.....	30.85 g
Na ₂ EDTA.2H ₂ O.....	3.72 g
Agua desionizada.....	1000 ml

- Disolver en 800 ml de agua
- Aforar a 1000 ml
- Almacenar a temperatura ambiente.

• **TBE 1X:**

TBE stock 10X.....	100 ml
--------------------	--------

- Aforar a 1000 ml con agua desionizada,

• **BROMURO DE ETIDIO:**

Bromuro de Etidio.....	10 g
Agua desionizada.....	19.8 ml

- Disolver
- Agitar la solución a temperatura ambiente en una botella ámbar

NOTA: UTILIZAR GUANTES. ESTE REACTIVO ES MUTAGENO.

• SOLUCION MAESTRA PCR:

REACTIVO	µL POR MUESTRA S/CONTROL INTERNO	µL POR MUESTRA + CONTROL INTERNO
Agua estéril	28.8	23.8
Gelatina (0.01%)	5	5
Amortiguador de PCR (17.5%)	5	5
dNTP's (10 µmoles)	4	4
Primer 1' (UMS-123) (40 µmoles)	1	1
Primer 2' (UMA-226) (40 µmoles)	1	1
Tag (0.2U)	0.2	0.2
Aceite Mineral	1 gota	1 gota
Nota: Para adicionar la muestra y el control interno se realiza en el cuartito #2.		
Muestra	5	5
Control Interno	5	5
TOTAL	50	50

BIBLIOGRAFIA.

1. Shepard MC. *Ureaplasma urealyticum* History and progress. *Pediatr Infect Dis* 1986; 5:S223-S231.
2. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. Manual of Clinical Microbiology. 6a ed, Washington: Board Editorial 1995. 11,328, 652-662, 1290-1291.
3. Cassell GH, Waites KB, Watson HL, Crousse DT, Harasawa R. *Ureaplasma urealyticum* intrauterine infection. Role in premature and Disease in Newborns. *Clinical Microbiology Reviews* 1993; 6:69-87
4. Blanchard A, Hentschel J, Duffy L, Baldus K, Cassell GH. Detection of *Ureaplasma urealyticum* by Polymerase Chain Reaction in the Urogenital Tract of Adults in Amniotic Fluid, and in the Respiratory Tract of Newborns. *Clin Infect Dis* 1993; 17(Suppl 1): S148-S153.
5. Harold L, Watson HL, Blalock De, Cassell GH. variable Antigens of *Ureaplasma urealyticum* Containing Both Serovar Specific and Serovar-Cross-Reactive Epitopes. *Infection and Immunity* 1992; 58:3679-3688
6. Zheng, Watson HL, Waites KB, Cassell GH. Serotype and Antigen Variation Among Invasive Isolates of *Ureaplasma urealyticum* from Neonates. *Infection and Immunity* 1992; 60:3472-3474.
7. Larry BV, Perrin JM, Cassell GH. *Ureaplasma urealyticum* polyarthritis in agammaglobulinemia 1985; 4: 687-691.
8. Waites KB, Duffy LB, Crousse DT, Dwosky ME, Strange MJ, Cassell GH "et al". Mycoplasma Infection of Cerebrospinal Fluid in Newborns Infants from a Community Hospital Population. *Pediatr Infect Dis J* 1990; 9:241-245.
9. Cassell GH, Crousse MT, Waites KB, Rudd PT. *Pediatr Infect Dis J* ; 7:535-541.
10. Agar Medium (A7) for Identification of *Ureaplasma urealyticum* (Human T Mycoplasma) in Primary Cultures of Clinical Material. *J Clin Microbiol Differential* 1976; 3:613-625.
11. Robinson DT, Webster ADB. *Ureaplasma urealyticum* in the Immunocompromised Host. *Pediatr Infect Dis* 1986; 5: S236-S238.

- 12 Robinson DT. The male reservoir of *Ureaplasma urealyticum* *Pediat Infect Dis* 1986; 5 S234-S235
- 13 Baron EJ, Finegold SM Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology 8va, St Louis U.S.A. The CV Mosby Company, 1990 55
- 14 Harrison HR Cervical colonization with *Ureaplasma urealyticum* and Pregnancy outcome Prospective studies *Pediat Infect Dis* 1986; 5 S266-S269
- 15 Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 9a, Baltimore Williams & Wilkins 1993 705-708
- 16 Balows A, Hauster WI, Hermann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ *Manual of Clinical Microbiology* 6a American Society for Microbiology Washington DC 1991 8, 268, 478-482, 1074
- 17 Castillo R, Watson HL, Hernández N, Gonzalez F, Muñoz O, et al Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica 1995, 13
- 18 Castillo R, et al Presencia de *Ureaplasma urealyticum* en niños con insuficiencia Respiratoria Aguda y Neumonitis XIX Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica 1994, 14 279
- 19 Braude AI, Davis ChE, Fierer J, *Microbiología Clínica* Edit Medica Panamericana 1984 594-602
- 20 Manilof J, McElhanev RN, Finch LR, Baseman JB, *Mycoplasmas Molecular Biology and Pathogenesis* American Society for Microbiology 1992 428-433
- 21 Ryan KJ, Champoux J, Falkows S, Plorde JJ, Drew WL, Neidhardt FC, et al *Sherris Medical Microbiology and Introduction to Infectious Diseases* Appleton and & Lange, Norwalk Connecticut 3ra ed 1994 373-377
- 22 Robertson JA, Honore HL, Steinke GW, serotypes of *Ureaplasma urealyticum* in spontaneous abortion. *Pediatric Infect Dis* 1996; 5 S270-S272
- 23 MacarmackWH, *Ureaplasma urealyticum*: Niche and Epidemiologic considerations. *Pediatric Infect Dis* 1986; 5 S232-S233
- 24 Shepard MC, Lunceford CD, Serological Typing of *Ureaplasma urealyticum* isolates from urethritis patients by agar growth inhibition method. *J Clin Micro* 1978; 8:574
- 25 Saunders BD, Trapp RG, *Bioestadística Médica* Manual Moderno 1993: 7-21

26. Wayne WD. Bioestadística. Bases para el análisis de las ciencias de la salud. Limusa México; 1978: 325-327.
27. Teng K, Li M, Yu W, Li H, Shen D, Lu D. Comparison of PCR with Culture for Detection of *Ureaplasma urealyticum* in clinical samples from Patients with urogenital Infections. *Journal of Clinical Microbiology* 1994; 32: 2232-2234.
28. Teng LJ, Zheng X, Glass JI, Watson HL, Tasai J, Cassell GH. *Ureaplasma urealyticum* biovar Specificity and diversity are encoded in Multiple Banded Antigen Gene. *J Clin Micro* 1994; 32:1464-69.
29. Gratard F, Soleihac B, De Barbeyrac B, Bebear C, Seffert D, Pozzetto P. Epidemiologic and Molecular investigations of genital *Mycoplasmas* for women and neonates at delivery. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14: 853-8.
30. Zheng X, Teng LJ, Watson HL, Glass JI, Blachard A, Cassell GH. Infection and Immunity Small Repeating Units within the *Ureaplasma urealyticum* MB Antigen Gene Encode serovar Specificity and are Associated with antigen Size Variation 1995; 63:891-98.
31. Davis L, Kuehl M, Battey J. Basic Methods in Molecular Biology. Apleton & Lange, Norwalk, Connecticut 1994: 745-751, 753.
31. Waites KB, Crouse DT, Phillips JB, et al. *Ureaplasma pneumoniae* and sepsis associated with persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatrics* 83: 84-89.
32. Estado Mundial de la infancia. UNICEF 1992.
33. Quinn PA, Li HCS, Dunn M. Serological Response to *Ureaplasma urealyticum* in the Neonate. *Clin Infect Dis* 1993; 17 (Suppl 1): S136-S143.
34. Waites KB, Crouse DT, Cassell GH. Antibiotic Susceptibilities and therapeutic options for *Ureaplasma urealyticum* infections in neonates. *Pediatr Infect Dis* 1992; 11:23-29.
35. Wals FW, Bulter J, Coalson J, Hensley D, et al. A Primate Model of *Ureaplasma urealyticum* Infection in the Pre-mature Infant with Hyaline Membrane Disease. *Clin Infect Dis* 1993; 17 (suppl 1)- S158-62.
36. Horn MA, Wolff C, Dressel P, et al. Polymerase Chain Reaction versus Culture for detection of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in the Urogenital tract of adults and the Respiratory tract of Newborns. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1996; 15: 595-598.

37. Cassell GH, Waites KB, Gibbs MS, Davis JK. Role of *Ureaplasma urealyticum*. *Pediatr Infect Dis* 1996; 5 S247-S252
38. Blachard A, Razin S, Kenny GE, Barile MF. Characteristics of *Ureaplasma urealyticum* Urease. *Journal of Bacteriology* 1988;17: 2692-2697
39. González P, Ortiz Z, Montiel Y, Ponce R. Frecuencia de aislamiento de *Ureaplasma urealyticum* en una población Abierta del sur de la Ciudad de Mexico. *Lat Amer Microbiol* 1995; 37 79-86
40. Freeman BA. *Microbiología de Burrows*. Edit Interamericana. 22 ed. 1986. 785-796
41. Kwok S, Higuchi R. Avoiding False Positives with PCR. *Nature* 1989; 339 237-238
42. McPerson MJ, Quirk P, Taylor GR. *PCR A Practical Approach*. 1994; 1 6-8.
43. Shepard MC. Culture Media for Ureaplasmas. In Razin S, Tully JG editors. *Methods in mycoplasmaology* 1983; 1
44. Jawetz E, et al. *Microbiología Médica*. Editorial el manual moderno 1990; 1. 125
45. Tully JG. *Mollicutes: Micoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *Clinical Infectious Diseases* 1993; 17 (Suppl 1): S1-9
46. Eschenbach DA. *Ureaplasma urealyticum* and Premature Birth. *Clinical Infectious Diseases* 1993; 17 (Suppl 1) S100-6
47. Sánchez PJ. Perinatal Transmission of *U. urealyticum*. Current Concepts Based on Review of the Literature. *Clinical Infectious Diseases* 1993; 17 (Suppl 1): S107-11.
48. Wang ELE, Cassell GH, Sanchez PJ, et al. *Ureaplasma urealyticum* and Chronic Lung Disease of prematurity: Critical Appraisal of the Literature on Causation. *Clinical Infectious Diseases* 1993; 17 (Suppl 1) S12-6