

11.2.3.87  
8



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

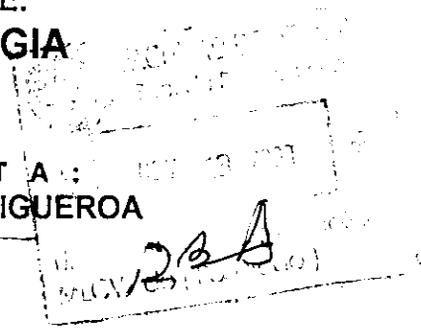
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGIA E  
INMUNOLOGIA PERINATAL

ESTUDIO DE EFICACIA DE UNA PRUEBA DE  
REACCION DE POLIMERASA EN CADENA  
PARA EL DIAGNOSTICO DE  
NEUROINFECCION NEONATAL POR  
UREAPLASMA UREALYTICUM

FASE DE ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE REACCION EN CADENA DE LA  
POLIMERASA

QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER  
EL TITULO DE:  
INFECTOLOGIA

PRESENTA:  
DR. JESUS REYNA FIGUEROA



TUTORES: DR. FEDERICO JAVIER ORTIZ IBARRA  
DR. FELIPE GONZALEZ VELAZQUEZ  
M. en C. JAVIER DIAZ GARCIA

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA



México, D.F.

Noviembre del 2000.



DIRECCION DE ENSEÑANZA



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGIA E INMUNOLOGIA PERINATAL

ESTUDIO DE EFICACIA DE UNA PRUBA DE REACCION DE POLIMERASA EN  
CADENA PARA EL DIAGNOSTICO DE NEUROINFECCION NEONATAL POR  
UREAPLASMA UREALYTICUM

FASE DE ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA.

Que como requisito para obtener el titulo de  
INFECTOLOGIA

Presenta:

Dr. Jesús Reyna Figueroa

Tutores: Dr. Federico Javier Ortíz Ibarra

. Dr. Felipe González Velázquez

M en C. Javier Díaz García

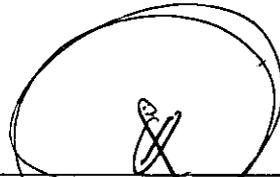
México DF

Noviembre del 2000

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA

---

Dr. José Luis Arredondo García  
Profesor Titular del curso de Infectología

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, loopy circle that encloses a smaller, more complex scribble. The signature is positioned above a horizontal line.

---

Dr. Federico Javier Ortiz Ibarra  
Asesor de Tesis

El presente estudio se llevó a cabo en el Departamento de Infectología e Inmunología Perinatal del Instituto Nacional de Perinatología, SSA, en los servicios de Microbiología y de Inmunología. En colaboración con la Unidad de Investigación del Hospital de Infectología Centro Médico la Raza, IMSS.

Este trabajo es parte de la primera fase del protocolo de investigación denominado "ESTUDIO DE EFICACIA DE UNA PRUEBA DE REACCION DE POLIMERASA EN CADENA PARA ÉL DIAGNOSTICO DE NEUROINFECCION NEONATAL POR UREAPLASMA UREALYTICUM"

Agradezco el apoyo proporcionado por La Unidad de Investigación del Hospital de Infectología del Centro Médico la Raza, en especial al Dr. Felipe González Velázquez, por su paciencia y apoyo en la realización de este trabajo.

## DEDICATORIA.

A Dios, que sigue sin dejarme solo, que me ha cuidado mucho y que me ha dado fuerza, cuando siento no poder más...

A mis padres, por enseñarme lo valioso de la vida y lo grande que es estar seguro de que siempre existirá una mano dispuesta a no dejarme caer, ó a levantarme sin reprochar mis errores. Gracias, por dejarme decidir y por no dejar que me equivocara.

A mis hermanos Pedro, Javier y Erika, por ser verdaderos amigos y por estar conmigo cuando más los he necesitado, y porque a pesar de andar caminos diferentes, continuamos creciendo juntos.

Al Dr. Ortiz, que me dio la oportunidad esperando no haberlo defraudado. A los Drs. Segura, Figueroa, Villagrana, Casanova, A las Drs Narcio, Hernández y a Norma, mi profundo agradecimiento por haber sido mis maestros y siempre tener respuesta a mis dudas.

A los niños, y a su dolor, piedra angular, que nos permite a los médicos aprender, espero haberlos servido aunque sea un poco, y esperando que su sufrimiento nos sirva a todos aliviar en forma más rápida y oportuna, a los niños que atenderemos en un futuro.

A ti niña, por ser mi ilusión, por las sonrisas y por permitirme conocerte y quererte...

## CONTENIDO

1) Resumen.....	1
2) Introducción.....	2
3) Justificación.....	5
4) Antecedentes.....	6
5) Objetivos.....	8
6) Material y métodos.....	9
7) Resultados.....	12
8) Discusión.....	18
9) Conclusión.....	20
10) Bibliografía.....	21

**RESUMEN:**

Como parte del estudio que pretende conocer la utilidad de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa en el diagnóstico de infección en sistema nervioso central, se reportan los avances en la primera parte del estudio que consiste en la estandarización de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en muestras de líquido cefalorraquídeo de recién nacidos, para conocer las condiciones en la que se obtiene amplificación del material genético de *Ureaplasma urealyticum*. Se analizaron 35 muestras en un total de 8 experimentos en un periodo de tiempo de agosto a octubre del 2000, con iniciadores que tienen como blanco el gene del Antígeno multibandeado de *Ureaplasma urealyticum*

Hasta el momento no se han encontrado las condiciones adecuadas que permitan desarrollar la prueba en muestras de líquido cefalorraquídeo, aunque se ha logrado amplificar en algunas ocasiones no es aún lo constante que debiera, para poder pasar a la siguiente fase del estudio con muestras clínicas de niños considerados como sépticos.

## INTRODUCCIÓN.

*Ureaplasma* Pertenece a la clase *Mollicutes*, familia *Mycoplasmataceae*, y ha sido bien definida por su capacidad de producir urea. Actualmente se acepta que el género *Ureaplasma* se divide en dos biovars, el uno (*U. parvum*) que contiene los serovares 1,3,6 y 14 que es el más común; y el Biovar dos (*U. urealyticum*) en los que se encuentran los serovares 2,4,5,7,8,9,10,11,12 y 13.

Es un organismo comensal del aparato urogenital en 40-80% de las mujeres sanas y el 66% de los neonatos nacidos de estas madres están colonizados.

Después de la infección del líquido amniótico por RPM, los *Mycoplasmas* pueden ser la causa de síndrome de dificultad respiratoria en el recién nacido, fiebre y neumonía que ocurre en las primeras horas de la vida. Los reportes de meningitis en los que *M. hominis* se han aislado de LCR o tejido cerebral, son resultado probablemente de una infección in útero, o de la colonización del recién nacido, con subsecuente diseminación. En adición este tipo de infección se observa con más frecuencia si existen anormalidades anatómicas, como espina bífida. La posibilidad de infección con *M. hominis* debe ser considerada en casos de enfermedad neonatal del sistema nervioso central, en los que los estudios bacteriológicos de rutina y técnicas de cultivo sean negativos. La patogénesis de infección por *Mycoplasmas* en SNC, no está clara.(1,2,3,4,5,6,9). *Ureaplasma* al igual que *M. hominis*, pueden invadir el LCR y puede verse particularmente en los primeros días de vida, en prematuros, con enfermedad respiratoria o hidrocefalia. La meningitis puede ocurrir en forma subclínica, o con daño neurológico severo. Algunos investigadores han considerado a *Ureaplasma*, como una causa común de infección en SNC, en neonatos. Aunque otros tienen opiniones contrarias.(1,2,3,4,8)

Existen informes ocasionales de meningitis por *U. urealyticum*, el primer caso informado fue reportado en los años 50's en la literatura, pero fue en 1988 cuando Waites y colaboradores, sugirieron que la infección del sistema nervioso central por este organismo es más frecuente de lo que se piensa. En su estudio de 100 pacientes, predominantemente prematuros, y de estado socioeconómico bajo, se cultivo liquido cefalorraquideo para *Mycoplasma genital*, como parte de la rutina en el trabajo de sepsis. Estos organismos crecieron en él liquido cefalorraquideo de 13 sujetos. La infección por *Ureaplasma* fue altamente correlacionada con hemorragia intraventricular e hidrocefalia.

La mayoría de los casos de infección por *M hominis* se presentan en recién nacidos prematuros, asintomáticos, los cuales en su mayoría presentan un liquido cefalorraquideo con valores normales incluso con erradicación espontanea del microorganismo en estudios subsecuentes. Los casos con *Ureaplasma urealyticum* en algunas ocasiones han llegado a reportar pleocitosis, pero sé a correlacionado a que son pacientes prematuros, con hemorragia intracraneal / intraventricular.(2,3,4,,5,7,12)

Los estudios sugieren que los *Mycoplasmas* pueden encontrarse en él liquido cefalorraquideo en un 4 a 13% de todos los neonatos, usualmente no induce respuesta inflamatoria, desaparece en forma espontanea, excepto cuando se asocia a infección por *Ureaplasma*, donde el proceso inflamatorio ocurre, y se asocia con hemorragia intraventricular. En los últimos 10 años, se ha mencionado aún más el papel de *Ureaplasma* en infecciones de vías respiratorias y de sistema nervioso. Sin embargo, se recomienda ser prudentes cuando se aísle este microorganismo en síndromes de SNC en neonatos, ya que la pleocitosis que se puede encontrar puede ser explicada por hemorragia intraventricular, sin embargo, es razonable el uso de eritromicina en casos en los que se aísle el organismo asociado con cambios en liquido cefalorraquideo.(6,7,9,11)

Existen diferentes puntos por aclarar. La fisiopatología de la infección del SNC, especialmente con perspectivas inmunológicas, Y aclarar si estas bacterias o algunas de ellas pueden tener acceso a meninges sin causar daño, y el seguimiento de los recién nacidos para determinar si existen consecuencias de esta infección. (1)

Algunos casos reportados han sido en recién nacidos pretérmino, cono sin malformaciones congénitas, de entre ellas espina bífida. La persistencia de *M. hominis* en liquido cefalorraquideo después de algunas semanas antes de la muerte de los recién nacidos con hidrocefalia post hemorrágica, se han reportado. En 1986, se reporta el aislamiento de *U. urealyticum* en ocho pacientes y cinco pacientes con *M hominis* con diagnósticos de sepsis y meningitis, en Alamaba (10,11,12)

Los hallazgos clínicos en niños, con infección del liquido cefalorraquideo, por *U. urealyticum* y *M. hominis*, pueden producir pleocitosis, con polimorfonucleares o mononucleares predominando, o la reacción inflamatoria puede ser mínima o ausente. En algunos pacientes, los organismos son erradicados espontáneamente, del LCR, pero en otros pueden persistir por semanas e incluso meses, a pesar del tratamiento antimicrobiano . la respuesta inflamatoria en LCR, cuando la presencia de *U. urealyticum* o *M. hominis*, ha sido verificado, en el liquido cefalorraquideo en múltiples ocasiones, puede lógicamente provocar cierto escepticismo, acerca de la significancia del la infección por *Mycoplasma* en el SNC. (2,3,4,5,6)

## JUSTIFICACIÓN

*Ureaplasma urealyticum*, es una bacteria que coloniza un gran porcentaje de mujeres en edad reproductiva, con transmisión en el recién nacido hasta de 66%. El espectro clínico de *Ureaplasma* en recién nacidos prematuros, varía desde la enfermedad respiratoria, sepsis y meningitis. A pesar de estas cifras la búsqueda de *Ureaplasma* como causante de infección en recién nacidos prematuros no es parte del protocolo de estudio inicial. Tal vez por la dificultad que conlleva el tratar de cultivar al microorganismo. En estas últimas fechas el estudio de PCR es un método que proporciona una forma más rápida y más sensible para el diagnóstico de infección por *Ureaplasma*, reportada con resultados favorables en especímenes de secreción pulmonar y orina, así como secreciones cervicales en adultos. En el INPer un porcentaje alto de pacientes son sospecha de sepsis y/o compromiso neurológico, no tienen aislamiento de germen alguno con las técnicas montadas para gérmenes frecuentes en este grupo de edad, quedando finalmente con el diagnóstico de infección sin germen aislado. Según la literatura, *Ureaplasma urealyticum* y el resto de *Mycoplasmas* tienen una participación importante como agentes causales de los mismos. Creemos importante corroborar o descartar el papel que juega *Ureaplasma urealyticum* en este grupo de pacientes, mediante una técnica que se ha reportado como sensible y específica, que proporciona un resultado rápido y que pudiera servir como parte del estudio de primera fase de dichos pacientes.

## ANTECEDENTES

La prevalencia de la enfermedad asociada con *Ureaplasma urealyticum* es probablemente subestimada por las limitaciones en el diagnóstico de laboratorio. Es un organismo fastidioso que requiere rigurosos controles de calidad en los medios de cultivo y algunos días de incubación. Este proceso es costoso y laborioso.

Algunas metodologías de Reacción en cadena de polimerasa desarrollada a principios de la década de los 80 por Mullis y sus colaboradores. Se basa en el principio de amplificar un fragmento de DNA en forma ilimitada en unas cuantas horas, de un sustrato en el que existan una o unas cuantas copias de RNA o DNA en particular, en cuestión de horas se pueden obtener suficientes copias de dicho gen como para detectarlo y estudiarlo. Para su realización se requiere de que los reactivos básicos sean expuestos a ciclos de cambio de temperatura, estos ciclos se conocen como desnaturalización, hibridación y polimerización. La desnaturalización es el inicio de cada ciclo. Para que la DNA polimerasa funcione, se necesita que ambas cadenas de DNA se separen, esto se consigue al exponer la doble cadena a altas temperaturas (94 grados). Después sigue la hibridación, que le confiere una alta especificidad a la PCR. La tercera fase es la polimerización, la fase en la que la DNA polimerasa agrega al iniciador las bases correspondientes. Al término de esta fase, una cadena doble de DNA se ha convertido en dos cadenas dobles de DNA.

Para la detección de *Ureaplasma*, se utilizan secuencias génicas de RNAr 16s, ureasa y antígeno multibandeado. Teng describió la utilización de iniciadores contra la región 5' del gene del antígeno multibandeado. Las ventajas de este ensayo incluye 1) Detección de todos los 14 serovares de *Ureaplasma*, 2) Nula detección de productos de las otras 17 especies de *Micoplasma* incluyendo las relacionadas más estrechamente como M

pneumoniae y 3) Distinción de amplificación de las cepas del biovar 1 (serovares 1,3,6,y14) y cepas del biovar 2 (serovares 2,4,5,7,8,9,10,11,12 y 13) (403 contra 448 bp, respectivamente. (1) Las cepas de *Ureaplasma* se pueden diferenciar por hibridación de DNA-DNA, polimorfismos por restricción de fragmentos largos y electroforesis en gel, así como amplificación por PCR (4) . El antígeno multibandeado es el antígeno reconocido  $\mp$  predominantemente durante la infección por *U. urealyticum* y es probablemente un determinante de virulencia importante (3)

De los 14 serovares de *U. urealyticum*, el serovar 3 es el más frecuentemente aislado. Por secuenciación directa del fragmento genico mba, se definieron cinco tipos de mba (1,3, y 6 ó biovar parvo) y mba 8 y X ó biovar T960, y 9 subtipos de mba (1a,1b,3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 6a y 6b, todos del biovar parvo). (2)

**OBJETIVOS.**

- 1) Estandarizar la prueba de Reacción en cadena de la polimerasa para *Ureaplasma urealyticum* en muestras clínicas de líquido cefalorraquídeo de recién nacidos.
- 2) Comprobar las condiciones adecuadas para la obtención, procesamiento y almacenamiento de muestras de líquido cefalorraquídeo, para la realización de la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Características de las muestras:** Se utilizaron 3 cepas de *Ureaplasma urealyticum* serovar 3 aislada de muestras clínicas de pacientes en la Unidad de Investigación del Hospital de Infectología del centro médico la Raza, almacenada a -70 grados (ATCC 27815). Así como muestras clínicas de LCR y de aspiración bronquial, a las que se les realizó inoculación con las cepas serovar 3 ya descritas y se realizaron diferentes diluciones, así como muestras de control negativo (agua) y de control interno.

**Iniciadores (oligonucleotidos).** Se utilizaron iniciadores UMS-125, y UMA-226 manufacturados en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chavez, basados en la publicación previa que describe la secuencia del gene del antígeno multibandeado del serovar 3 de *Ureaplasma urealyticum*

Sentido 5'a 3' UMS-125 (GTATTTGCAATCTTTATATGTTTTCG)

Antisentido 3'a 5' (UMA 226 CAGCTGATGTAAGTGCAGCATTAAATTC).

Ambos como ya se mencionó teniendo como sitio blanco el gene del antígeno multibandeado

### Preparación de DNA.

La preparación y extracción del DNA de las muestras se realizó bajo el siguiente procedimiento, como se ha descrito en publicaciones previas.

1. Centrifugar 400 µl de la muestra con una velocidad de 14,000 r.p.m., por un tiempo de 30 minutos y a una temperatura de 4 grados centígrados.
2. Bajo una campana de flujo laminar se procede a retirar el sobrenadante con una pipeta tratando de dejar el botón donde se considera se encuentra el material de la cepa procesada.

3. Sé agregar 100  $\mu$ l de proteincinasa (PK) (0.25mg/ml)
4. Se procede a calentar durante una hora a 60 grados centígrados de temperatura en "baño María", para permitir la apertura de material genómico
5. Posteriormente se calienta por 10 minutos a 94 grados centígrados para desactivar la proteincinasa
6. Colocar la muestra en hielo o en refrigerador a  $-20$  grados centígrados por 10 minutos.
7. Guardar a  $-70$  grados hasta realizar PCR
8. Cabe mencionar que para cada muestra se colocó un control negativo con 400  $\mu$ l de agua destilada

### Reacción en Cadena de la Polimerasa

Antes de iniciar la prueba se debe preparar la mezcla maestra y adicionar 45  $\mu$ l en cada tubo de PCR. A continuación se establece la cantidad de cada uno de los componentes de la muestra maestra para PCR

MEZCLA DE PCR CONC STOCK	$\mu$ l x muestra x vol x muestra						
	1	2	3	4	5	6	
H2O	28.8	57.6	86.4	115.2	144	172.8	
Gelatina	5	10	15	20	25	30	
Buffer PCR	5	10	15	20	25	30	
dNT'Ps	4	8	12	16	20	24	
Primer 1	1	2	3	4	5	6	
Primer 2	1	2	3	4	5	6	
Taq	0.2	0.4	0.6	0.8	1	1.2	
Aceite mineral	1 gota						
Templado DNA	5						
Total	50mcl						
FECHA							

1	9	17	25
2	10	18	26
3	11	19	27
4	12	20	28
5	13	21	29
6	14	22	30
7	15	23	31
8	16	24	32

Posteriormente se agrega a los tubos Eppendorff para PCR, 5  $\mu$ l de la muestra clínica

Iniciar ciclado, bajo las siguientes condiciones de reacción:

Paso I: Desnaturalización. A 94 grados centígrados por 00 segundos

Paso II. Desnaturalización a 94 grados centígrados por 20 segundos

Paso III Alineación a 57 grados centígrados por 00 segundos

Paso IV Alineación a 57 grados centígrados por 60 segundos

Paso V Extensión de la cadena a 72 grados centígrados por 00 segundos

Paso VI Extensión de la cadena a 72 grados centígrados por 60 segundos.

Se repiten los pasos durante 35 ciclos más.

Posteriormente se continúa con un programa de extensión que dura 5 minutos a 72 grados y termina el ciclado de la PCR.

#### **Análisis de las muestras amplificadas.**

Los productos de PCR se analizaron electroforéticamente en un gel de agarosa al 2%,

Elaborar mezcla para gelatina\* Bromuro de etidio \*\*,TAE 1x.\*\*\*

Agregar la muestra a la gelatina. Muestra 7  $\mu$ l + marcador 7  $\mu$ l= 14  $\mu$ cl. Marcador de peso molecular 7  $\mu$ cl.

## Resultados.

Se realizaron 8 ensayos en un periodo de tiempo comprendido entre agosto a octubre del 2000, en las cuales la distribución de muestras fue la siguiente:

1 (2), 2 (3), 3 (3), 4 (4), 5 (6), 6 (8), 7 (3), 8 (6)., Con un total de 35 muestras analizadas, de las cuales solo 7 fueron positivas, en tiempos distintos.

A continuación se mencionan las características y los cambios realizados en la prueba tratando de amplificar DNA de *Ureaplasma*.

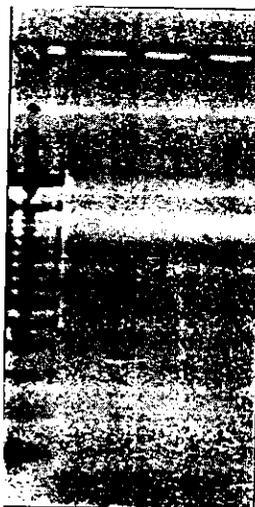
### Experimento I.

Se inicia estandarización de la técnica, utilizando una cepa de *Ureaplasma urealyticum*, más un control negativo (agua). Se extrae DNA y se corre PCR y gel, donde se observa únicamente corrimiento del marcador de peso molecular, no se observa banda de la muestra



### Experimento 2.

Se inocula a líquido cefalorraquídeo de paciente DNA de una cepa serovar 3 de Ureaplasma, haciendo cinco diluciones previamente y corriendo la número 4. Además se inoculó una muestra clínica de un paciente con sospecha de infección por Ureaplasma (aspirado bronquial) (también se sembró en medio para cultivo haciendo cinco diluciones. La del paciente con cultivo positivo y LCR negativos) Así mismo una tercera muestra (cepa serovar 3 guardada con anterioridad a  $-70$  grados) (tres muestras más un control negativo). Se corre PCR de muestra de LCR y paciente sin lograr amplificar DNA. Se decide agregar a la mezcla general, gelatina y se utilizan nuevos iniciadores y DNA polimerasa.



### Experimento 3

Se inicia nuevo muestreo, esta ocasión con las siguientes muestras; control interno, Muestra de cepa conocida anteriormente mencionada como DNAp y control negativo. Se

cambio en esta ocasión iniciadores y DNA polimerasa. (tres muestras) En esta ocasión se logra amplificar DNA del CI y de la muestra DNAp en doble ocasión, logrando corrimiento en el gel.



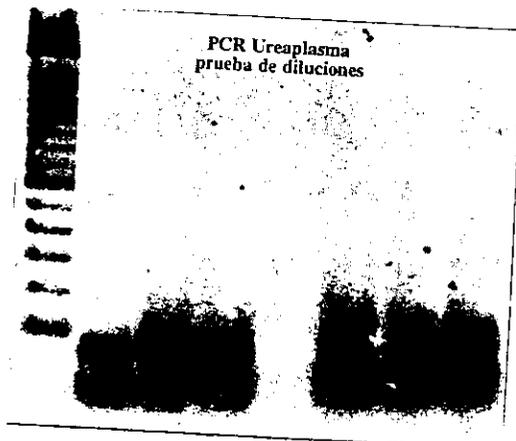
#### Experimento 4

Para comprobar que los cambios hechos fueron adecuados (nucleotidos y DNA polimerasa) En esta ocasión se corrieron las siguientes muestras; 1) muestra que sé corrió en el experimento del día -08-00. 2) DNA extraído por Othon. 3) LCR trabajado el día 08-00 4) control interno. Se realiza PCR en la que se observa amplificación de la muestra 1,2 y 4, siendo negativo para LCR. Se acuerda realizar nuevo experimento para mejorar la técnica de extracción. Además se corre 30 minutos más observándose desaparición de la banda de la muestra 1, se acuerda solo correr 35 minutos a 120 V.



### Experimento 5

Se extrae DNA de muestra serovar 3 diluyendo en 5 medios (cinco diluciones) y una sin diluir. Planeando hacer PCR para las 6 muestras. Los resultados del corrimiento negativos para todas las muestras, con cultivo positivo de las diluciones 1,2,3,4, y sin diluir.



Por observarse gran cantidad de nucleotidos en el gel, se decide diluir los iniciadores de la siguiente manera USM 10 mcl + 75 mcl de agua, y UMA 10 mcl + 89 mcl de agua.

### **Experimento 6**

Se corren con esta nueva dilución 8 muestras 3 ya manejadas anteriormente (DNAP, muestra 6 sin diluir anterior y control interno, asi como 5 utilizando técnica de muestra directa llamadas M, CI, 3,C+. C-, siendo todas negativas.

### **Experimento 7**

Cambio de temperatura de alineación a 65 grados en lugar de 56 grados, para control interno y control 1, y muestra, siendo negativas.

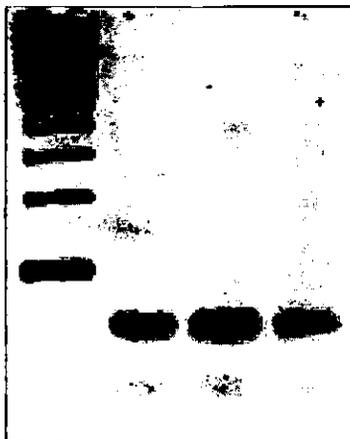
Para valorar la utilidad del iniciador, se corren estos en forma directa siendo ambas positivas.

Se cambian condiciones bajo las siguientes características.

DNTP 2 milimol (diluir 20 en 80) y aplicar 2.4 por muestra, 3 mcl de buffer, Mg 2mcl, iniciador diluidos 2 mcl en 18 mcl de agua, en total 20 mcl, del cual se toman 1.5 mcl por muestra, enzima 1 mcl. Se realizan 5 muestras dos en forma directa de la muestra extraída de DNA (2mcl, 5mcl y 10 mcl) y dos diluciones de la misma muestra (dil 1:10, y dil 1:100) 1:9; 1:99 respectivamente..



**Experimento 8** Siendo los resultados de la siguiente manera (diluciones positivas) muestra con 2mcl y 5 mcl positivas, la de 10 y el agua negativa. Sin embargo la claridad no es suficiente, por lo que se correrán nuevamente con temperatura de alineamiento de 59 grados.



## Discusión.

La reacción en cadena de la polimerasa es una prueba que en los últimos años ha mostrado una gran utilidad en cuestiones de diagnóstico. Los reportes para el diagnóstico de *Ureaplasma urealyticum* con la PCR han demostrado sensibilidad y especificidad semejante a la del cultivo, con la ventaja de ser más rápida, y de requerir menos cuidado para su desarrollo. Hasta la fecha se ha manejado para la detección del material genético en muestras clínicas de pacientes como: Aspirados bronquiales, flujo vaginal y cervical, líquido amniótico, material peritoneal, tejido placentario y endometrial.

Son pocos los reportes en la literatura que mencionan a esta prueba para el diagnóstico de neuroinfección, siendo prácticamente todos reportes de casos, por eso consideramos importante el tratar de conocer si la prueba es eficaz en dicho diagnóstico. Existen informes ocasionales de meningitis por *Ureaplasma*, que sugieren que la infección del sistema nervioso central por este agente es más común de lo que se piensa, sin embargo las condiciones para su cultivo son muy complicadas, por ser un microorganismo carente de pared celular y con alta sensibilidad a los cambios de osmolaridad, y con necesidades nutricionales muy estrictas.

Hasta la fecha la estandarización de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa, aparece en la literatura en forma frecuente para múltiples muestras clínicas ya mencionadas con anterioridad, sin embargo para líquido cefalorraquídeo no existe, la explicación al respecto es:

- 1) La dudosa participación patológica que algunos artículos han reportado de este germen, algunos sugieren que su aislamiento no tiene ningún valor diagnóstico y que ni siquiera vale la pena dar tratamiento en caso de encontrarlo

## **ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA**

19

2) La existencia en LCR de inhibidores, que no permiten en ocasiones adecuada extracción de DNA de Ureaplasma, por lo que la técnica de centrifugado, y de conservación debe ser siempre estricta, tratando de separarlos del material genético.

Esta dificultad se ha visto reflejada en nuestro estudio, ya que hasta el momento a pesar de que se ha logrado amplificar DNA en algunos experimentos, no ha sido lo común, ni lo frecuente, que nos permitan considerar, continuar experimentando ya con líquidos cefalorraquideos, para pasar a la siguiente fase que sería buscar el Ureaplasma en especímenes clínicos de líquido cefalorraquideo obtenidos de recién nacidos considerados como sépticos. Las explicaciones en este momento, después de cambiar varias de las condiciones del experimento, es que los nucleótidos utilizados en la prueba, no sean adecuados o no estén funcionando como se espera., Esto explicado de una manera sencilla: La prueba para especímenes que se montaron: (aspirado bronquial) ya estaba estandarizada y se había logrado amplificar sin problema, con nucleótidos solicitados de Birminham Alabama, en este experimento se utilizaron nucleótidos nuevos, y estaban siendo probados. En este momento se plantean dos soluciones para corregir estos problemas, en primer lugar solicitar nuevos nucleótidos y dos manejar también otro tipo de iniciadores como los dirigidos hacia el gene de la ureasa, lo cual está pendiente decidir.

### Conclusiones.

- Los resultados hasta el momento no son los que se esperaban, por lo que se manejarán nuevas condiciones en la estandarización de la técnica,
- Sobre todo ya trabajando directamente con líquidos cefalorraquídeos, para esto, iniciaremos cambiando primers, que sería el paso a seguir,
- Aunque al final, hubo amplificación de DNA, no es aún claro al revelarlo en el gel, por lo que no se puede decir que las condiciones ya son favorables.

## BIBLIOGRAFIA.

1. Wientzen R. Genital mycoplasmas and the pediatrician. *Pediatr Infect Dis J*, 1990;9:232-235.
2. Taylor D, infections Due to Species of Mycoplasma and Ureaplasma: An Update. *CID* 1996; 23:671-84.
3. Ulmer j, Donnelly J, Liu m, DNA Vaccines Promising. A new Approach to Inducing protective Immunity. *CID* 1993; 17 (suppl 1)
4. Razin S, Yogev D, Naot Y, Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas . *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 1094-1156.
5. Cherry J, Mycoplasma and ureaplasma infections Cap 195, En: *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*, Feigin R, 4ta edition .Editorial Saunders Company 1998,2259-2286.
6. Alonso C, Wauters N, Vermeyleen D, Muller M, Serruys E, A Fatal Case of Mycoplasma hominis Meningoencephalitis in a Full-Term Newborn. *Journal Clin Microbiol*. 1997; 35: 286-287.
7. Wientzen R. Genital mycoplasmas and the pediatrician. *Pediatr Infect Dis J*, 1990;9:232-235.
8. Siber G, Alpert S, Smith A, Lin J, McCormack W. Neonatal central nervous system infection due to Mycoplasma hominis. *J Pediatr* 1977;90:635-7.
9. Hjelm E, Jonsell G, Linglof T, Mardh P, Moller B, sedin G. Meningitis in a new born infant caused by Mycoplasma hominis. *Acta Paediatr Scand* 1980;69:415-8.

10. Lerer RJ, Kalavsky S. Central nervous system disease associated with *Mycoplasma pneumoniae* infection: report of five cases and review of the literature. *Pediatrics* 1973; 52:658-68.
11. Lederman MM, Ellner JJ. Presence of antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* in patients with bacterial meningitis. *J Infect Dis* 1983; 148: 363-5.
12. Kleemola M, Kaythy H, Increase in titers of antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* in patients with purulent meningitis. *J Infect Dis* 1982; 146: 284-8.
13. Taylor D, infections Due to Species of *Mycoplasma* and *Ureaplasma*: An Update. *CID* 1996; 23:671-84.
14. Narita M, Matsuzono Y, Togashi T, Kajii N, DNA diagnosis of Central Nervous System Infection by *Mycoplasma pneumoniae*. *Pediatrics* 1992; 90: 250-3.
15. Ulmer J, Donnelly J, Liu M, DNA Vaccines Promising. A new Approach to Inducing protective Immunity. *CID* 1993; 17 (suppl 1)
16. Razin S, Yogeve D, Naot Y, Molecular Biology and Pathogenicity of *Mycoplasmas*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 1094-1156.
17. Cherry J, *Mycoplasma* and *ureaplasma* infections Cap 195, En: *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*, Feigin R, 4th edition. Editorial Saunders Company 1998, 2259-2286.