



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA ISIDRO ESPINOSA
DE LOS REYES
DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGIA E INMUNOLOGIA

EVALUACIÓN DE UNA PRUEBA DE DETECCIÓN RÁPIDA APLICADA EN SECRECIÓN BRONQUIAL, PARA EL DIAGNÓSTICO DE NEUMONIA POR *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* EN NEONATOS DE LA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS E INTERMEDIOS NEONATALES DEL INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA “ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES EN COMPARACIÓN CON MÉTODOS TRADICIONALES DE DIAGNÓSTICO

T E S I S

Que para obtener el Título de:

ESPECIALISTA EN INFECTOLOGIA

P R E S E N T A

DR. RAFAEL GALVAN CONTRERAS

DR. FEDERICO JAVIER ORTIZ IBARRA
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACION

DR. JESUS REYNA FIGUEROA
DIRECTOR DE TESIS
COTUTOR: QBP. GRACIELA VILLEDA GABRIEL



MEXICO D.F

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

**INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA
ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES**

AUTORIZACION DE TESIS

TITULO

EVALUACIÓN DE UNA PRUEBA DE DETECCIÓN RÁPIDA APLICADA EN SECRECIÓN BRONQUIAL, PARA EL DIAGNÓSTICO DE NEUMONIA POR *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* EN NEONATOS DE LA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS E INTERMEDIOS NEONATALES DEL INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA "ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES" EN COMPARACIÓN CON MÉTODOS TRADICIONALES DE DIAGNÓSTICO

DR. JOSE JORGE ESPINOZA CAMPOS

DIRECTOR DE ENSEÑANZA

DR. FEDERICO JAVIER ORTIZ IBARRA

PROFESOR TITULAR DEL CURSO

DR. JESÚS REYNA FIGUEROA

DIRECTOR DE TESIS

QBP. GRACIELA VILLEDA GABRIEL

COTUTOR DE TESIS

INDICE

CAPITULO I: GENERALIDADES

1.1 Introducción	6
1.2 Marco Teórico	8

CAPITULO II: CARACTERISTICAS DEL ESTUDIO

2.1 Planteamiento del Problema.....	22
2.2 Justificación.....	22
2.3 Hipótesis.....	23
2.3 Objetivos.....	23
2.4 Material y Métodos.....	25
2.5 Diseño de estudio.....	25
2.6 Lugar y duración.....	25
2.7 Universo.....	25
2.8 Criterios de Inclusión y No inclusión.....	25
2.1.1 Descripción general del estudio y procedimientos.....	26
2.2.1 Variables operacionales.....	31
2.3.1 Análisis Estadístico.....	33

CAPITULO III.- RESULTADOS

3.1. Resultados.....	34
----------------------	----

CAPITULO IV.- DISCUSION Y CONCLUSIONES

4.1 Discusión..... 42

4.2 Conclusiones..... 45

BIBLIOGRAFÍA46

ANEXOS..... 49

INTRODUCCION

Ureaplasma y ***Mycoplasma*** son microorganismos implicados en enfermedades neonatales y maternas. Estos agentes, se ha encontrado en necropsias en diferentes órganos neonatos. Algunos estudios establecen la importancia de la colonización del ***Ureaplasma urealyticum*** en la superficie coriónica de la placenta, ***M. hominis*** es una especie que se aísla con frecuencia en el aparato genital. La colonización ocurre tras la pubertad como resultado del contacto sexual y su aislamiento generalmente no indica la existencia de enfermedad. Se han descrito infecciones respiratorias y del sistema nervioso central (SNC) por ***M. hominis*** en recién nacidos que han adquirido la infección en el canal del parto. Ambos agentes (***Ureaplasma*** y ***Mycoplasma***) son causa importante de neumonía en los neonatos sujetos a factores de riesgo (ventilación mecánica, distrés respiratorio, membrana hialina) en unidad de cuidados intensivos neonatales.

Los micoplasmas genitales que tienen repercusión perinatal más importantes son ***Ureaplasma urealyticum*** y ***Mycoplasma hominis***, son bacterias que requieren medios complejos y suplementados para lograr su crecimiento, lo que ha dificultado la confirmación diagnóstica. El cultivo de aspirado bronquial a sido una herramienta valiosa sin embargo, el uso de nuevos dispositivos para efectuar un diagnóstico rápido y oportuno nos permite iniciar un tratamiento de forma precoz en pro del bienestar de los neonatos.

Ambos agentes son de gran importancia en infectología neonatal, ya que se han aislado en cultivos de líquido pleural , aspirado bronquial, ya que se les ha vinculado en cuadros clínicos como: sepsis, neumonía, meningitis, artritis séptica, en la formación de cálculos renales, [absceso](#) cerebral, abscesos subcutáneos. Y en el caso de infección por ***ureaplasma*** se ha vinculado con efectos teratogénicos en etapa fetal. Se menciona la participación de ambos agentes en ruptura prematura de las membranas corioamnióticas, parto pretérmino.

Cultivo e identificación de *M. hominis* y *Ureaplasma spp*: La detección e identificación de micoplasmas y ureaplasmas se realiza por métodos

convencionales, como son el cultivo bacteriológico, pruebas bioquímicas, enzimáticas y serológicas; además de técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus diversas variantes. El diagnóstico convencional se basa en el cultivo en placas de agar A7, seguido de la identificación macroscópica de las colonias de ***Ureaplasma urealyticum*** (colonias en forma de erizo marítimo) o ***Mycoplasma hominis*** (colonias en forma de huevo estrellado). En general las muestras biológicas pueden ser cultivadas en medio de cultivo F líquido, suplementado con arginina y específico para ***M. hominis***, y en medio de cultivo U/N líquido, suplementado con urea y específico para ***Ureaplasma spp.*** Los cultivos se incuban a 37 °C y cada 48 h se observan hasta visualizar cambio de coloración como indicador del incremento de unidades cambiadoras de color por mililitro (UCC/mL), los que se clasifican como positivos a micoplasmas o ureaplasmas, o ambos, son aquellos en los que hay cambio de coloración, mientras que los cultivos sin cambio de coloración en el transcurso de 7 días son diagnosticados como negativos para estos microorganismos.

En el Instituto Nacional de Perinatología la identificación de estos microorganismos se realiza a través de medios de cultivo caldo Urea y Arginina para detectar ***M. hominis* y *Ureaplasma spp.*** inoculando por lo menos 50 microlitros de muestra en cada medio.

RESUMEN

En este protocolo de investigación se busca evaluar la eficacia de una prueba de detección rápida, aplicada en aspirado bronquial , ya que no se tiene referencia en la literatura reporte de esta prueba de detección rápida que se haya aplicado en este tipo de secreción , la finalidad de la prueba es detectar *M. hominis* y *U. urealyticum* , en secreción bronquial , con la finalidad de facilitar de manera más precoz, el diagnóstico de neumonía neonatal causada por estos agentes.

Se comparan los resultados obtenidos, con el método tradicional de diagnóstico y el crecimiento de estos microorganismos en caldo urea o caldo arginina, con posterior crecimiento en Agar A7.

Se analizaron 17 casos de neonatos sujetos a factores de riesgo para efectuar este tipo de estudio.

SUMMARY

In this protocol of investigation one looks for to evaluate the effectiveness of a test of fast detection, applied in aspired bronchial, since reference in Literature is not had reports of this test of fast detection that it has been applied in this type of secretion, the purpose of the test is to detect *M. hominis* and *U. urealyticum*, in bronchial secretion, in order to facilitate of precocious way, the diagnosis of neonatal pneumonia caused by these agents. The obtained results are compared, with the traditional method of diagnosis and the growth of these microorganisms in urea broth or broth arginine, with later growth in A7 Agar. 17 cases of neoborn subjects to risk factors were analyzed to carry out this type of study.

PLANTEAMIENTO Y DELIMITACION DEL PROBLEMA

¿El uso de una prueba rápida de detección(Mycofast Evolution 3) es un método diagnóstico útil en la detección de ***Ureaplasma urealyticum*** y ***Mycoplasma hominis***. cuando se utiliza en secreción bronquial de neonatos hospitalizados en la Unidad de cuidados intensivos neonatales y cuidados intermedios neonatales del INPerIER comparado con el método convencional de diagnostico de cultivo en caldo urea y caldo arginina y placas de Agar A7?

MARCO TEÓRICO

Los micoplasmas genitales que tienen repercusión perinatal son ***Ureaplasma urealyticum*** y ***Mycoplasma hominis***. Los micoplasmas fueron aislados y descritos por primera vez en 1898 por Nocard y Roux, quienes aislaron el ***Mycoplasma mycoides*** de casos de pleuroneumonía bovina. En ese mismo siglo se aisló de carneros y cabras la segunda especie de micoplasmas y se les denominó PPLO (*Pleuropneumoniae liorganism*). El primer micoplasma aislado de humanos (***Mycoplasma hominis***) fue recuperado en 1938 de un absceso de las glándulas de Bartholin. En 1944, Eaton y colaboradores lograron aislar ***M. pneumoniae*** de un caso de neumonía atípica primaria, pero pensaron que se trataba de algún virus, mientras que Marmion y Goodburn. Los micoplasmas, descubiertos por Shepard en 1954, microorganismos procariotes carentes de pared celular. En 1974 se propuso el nombre de ***Ureaplasma urealyticum*** para una nueva especie que pertenece al género ***Ureaplasma***, familia *Mycoplasmataceae*, el cual se distingue de los micoplasmas por la presencia de la enzima ureasa, capaz de metabolizar urea (6)

Los micoplasmas pertenecen a la clase *Mollicutes*, al orden *Mycoplasmatales* y a la familia *Mycoplasmataceae*. Ésta cuenta con dos géneros, *Mycoplasmas* y *Ureaplasmas*. En la actualidad el género *Mycoplasma* está formado por más de cien especies (7)

En general, en la clase **Mollicutes** se encuentran 3 órdenes y 4 familias en las cuales se encuentran contenidos 6 géneros: 1) ***Mycoplasma*** 2) ***Ureaplasma*** 3) ***Spiroplasma***. 4) ***Acholeplasma*** 5) ***Anaeroplasma*** 6) ***Asteroplasma***. Los micoplasmas tienen la característica de carecer de pared celular rígida, son incapaces de sintetizar una peptidoglicana o sus precursores, y por lo tanto son resistentes a la penicilina y a sus análogos, pero sensibles a la lisis por choque osmótico, detergentes, alcoholes y anticuerpos específicos más completos. (7)

Los índices de infección del tracto genital femenino por estos agentes, estarán en relación con los índices de infección en neonatos. En México en el INPer : Se realizó un estudio en la clínica de ITS en 1989 para

conocer la etiología y prevalencia de las infecciones cervicovaginales por ***Mycoplasma hominis*** y ***Ureaplasma urealyticum*** de mujeres que acudían a esta institución, el cual mostró cifras de recuperación de micoplasmas del 21.5% en mujeres no embarazadas y la asociación con los hallazgos clínicos, así como factores de riesgo asociados como el uso de dispositivos intrauterinos y el número de parejas sexuales. Otro estudio realizado en esta misma institución en 1995 de prevalencia de infección cervicovaginal por ***Mycoplasma hominis*** y ***Ureaplasma urealyticum*** en pacientes ginecológicas reporto 1 783 casos, se encontró 3.9% (71 casos) de positividad general, correspondiendo a ***Mycoplasma hominis*** el 64.7% de los aislamientos (46 casos) ***Ureaplasma urealyticum*** 35.3% (25 casos) (6 , 9).

En mujeres embarazadas, en México, ambos agentes se ha encontrado como causa de infección cervical en alrededor del 25% de ellas; en los Estados Unidos se refiere hasta en un 40% de las mujeres. Los micoplasmas en general durante la gestación pueden producir corioamnioitis, y RPM. Sin embargo en México, en INPerIER es más frecuente la infección cervical por **C. trachomatis**, que por ***Mycoplasma hominis*** y ***Ureaplasma urealyticum***, es por ello que la afección de recién nacido, en dicha institución se debe más frecuentemente a infección por ***C. Trachomatis*** (9).

La transmisión de la infección por ambos agentes es por vía ascendente, secundaria a colonización de tracto genital materno, la colonización vía transplacentaria es importante, con índice de transmisión vertical: 18 – 55% entre recién nacidos (3).

A nivel respiratorio la manifestación clínica más común en el recién nacido es la neumonía intersticial, semejante a lo descrito para ***C. trachomatis***, en los cuales generalmente coexisten prematurez o bajo peso al nacimiento. Sobre todo la infección por ***Ureaplasma*** se ha vinculado con neumonía congénita. En ausencia de infecciones adyacentes por virus, hongos u otros agentes bacterianos (8,9).

Hallazgos sugestivos de neumonía por *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* en feto y RN: (3)

1. ***U. urealyticum*** ha sido aislado de líquido, amniótico entre las 17 y 24 semanas de edad gestacional, en ausencia de otros organismos y ante membranas integra, no así ***Mycoplasma hominis***.
2. Ambos se ha aislado de secreciones endotraqueales al momento de parto, en RN con evidencia de enfermedad respiratoria.
3. El aislamiento de ambos en secreciones endotraqueales se asocia francamente con datos radiográficos de neumonía y aumento de PMN en aspirado traqueal 2 días después del nacimiento. el nacimiento
4. Ambos inducen la citólisis de células de la tráquea, condiciona neumonía, aumento en el número de fibroblastos en pulmón y aumento en la síntesis de IL 6 y 8 **(3)**.

La neumonía causada por estos agentes da lugar a manifestaciones inespecíficas, cuando la transmisión es vertical in útero, se manifiesta a menudo en las primeras 24 horas de vida, los hallazgos clínicos más frecuentemente encontrados son: polipnea, y datos de dificultad respiratoria(manifestaciones francamente inespecíficas), sin embargo también pueden condicionar cuadros neumónicos que se manifiestan más tardíamente, sobre todo en neonatos sujetos a ventilación mecánica en medios hospitalarios . Los hallazgos de laboratorio y radiográficos son sumamente inespecíficos, confundiéndose a menudo con enfermedad de membrana hialina, entre otras. **(18)**.

PATOGENICIDAD DE Ureaplasma urealyticum

El interés por su estudio deriva de su identificación en cultivos de sangre, fluido cerebroespinal, secreciones traqueobronquial y del tejido pulmonar y por la sospecha de que puede ser causa de enfermedad invasiva en neonatos pretérmino. La enfermedad pulmonar crónica, considerada entre los problemas comunes de los recién nacidos con peso bajo, se caracteriza inicialmente por el

aumento en el número de macrófagos, de polimorfonucleares, de células epiteliales y endoteliales de las vías aéreas, y por el incremento de los linfocitos T, linfocitos B, células NK, fibroblastos y concentración elevada de citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral-alfa, IL-1b, IL-6 y IL-8, que contribuyen a la reacción inflamatoria presente en la enfermedad pulmonar crónica. **(8, 9, 10,11).**

En etapas avanzadas se observa fibrosis pulmonar, por lo que estos niños requieren de oxígeno por periodos prolongados y puede ser causa de su muerte. La colonización del tracto respiratorio se ha asociado con la alta incidencia de neumonía, hemorragia intraventricular y enfermedad pulmonar crónica. La colonización experimental con *Ureaplasma urealyticum* causa, en monos, una bronquiolitis aguda con ulceración epitelial e infiltración de células polimorfonucleares **(11).**

También son sensibles a los antibióticos que actúan a nivel de síntesis de proteínas, como las tetraciclinas, y algunos de ellos son sensibles a la eritromicina y sus derivados como la azitromicina y la claritromicina. Se encuentran limitados únicamente por una membrana plasmática, son filtrables, su tamaño se encuentra comprendido entre los 300 y 800 *nm* y por ello se les considera como los microorganismos más pequeños de vida libre. **(7)**

Tienen una capacidad biosintética limitada, por lo que se requieren medios complejos para su crecimiento que contienen caldos cerebro-corazón, peptona, extracto de levadura y suero de algunos mamíferos como fuente de colesterol. Al crecer en los medios de cultivo, sus colonias presentan generalmente la forma de *huevo frito* con un diámetro de 0.3 a 0.6 *nm* y es por ello que no se observan a simple vista. Actualmente se cuenta con los estudios de biología molecular que nos ofrecen pruebas más específicas y sensibles para su identificación definitiva, como la técnica de reacción de polimerasa en cadena (PCR).

El mayor reservorio de cepas humanas del *U. urealyticum*, es el tracto genital femenino, siendo especialmente importante la colonización en mujeres embarazadas, que se describe en 40 a 80% de ellas. Entre los factores de riesgo de colonización por *U. urealyticum* se encuentran: madre primigesta, gestante adolescente, bajo nivel socioeconómico, promiscuidad sexual, enfermedades de transmisión sexual, vaginosis bacteriana, uso de anovulatorios orales, consumo de tabaco y drogas (como conductas de riesgo). El aislamiento de *U. urealyticum* en líquido amniótico y placenta de la mujer embarazada, ha sido asociado a resultados perinatales adversos, tales como: corioamnionitis, RPM, parto prematuro, abortos recurrentes y mortinatos. La transmisión de *U. urealyticum* de la madre al recién nacido se produce por vía vertical, lo que es significativamente más frecuente en RN de muy bajo peso al nacer (hasta en 89%), que en los RN de término. No obstante que aún hay controversia acerca del comportamiento dual de los micoplasmas en la flora habitual vaginal, donde se pueden observar como comensales de este nicho, sin embargo, en situaciones propicias, tanto *Mycoplasma hominis* como *Ureaplasma urealyticum* se han encontrado estrechamente relacionados con cuadros de repercusión perinatal y enfermedad ginecológica (4) desde el punto de vista obstétrico se menciona su asociación a ruptura prematura de las membranas corioamnióticas, parto pretérmino e infección fetal y neonatal. De igual forma, su participación como copatógeno en los cuadros de vaginosis bacteriana, así como su papel protagónico en las enfermedades que afectan la salud reproductiva, como la enfermedad pélvica inflamatoria y los trastornos de la fertilidad, nos obligan a realizar una búsqueda intencionada de estos microorganismos en mujeres con infección vaginal. (6)

En Latinoamérica, existe escasa información sobre este microorganismo y su aislamiento en el binomio madre hijo. (6)

Por otro lado, ratones recién nacidos inoculados con esta bacteria desarrollan neumonía intersticial aguda; estos resultados hacen pensar que este germen puede provocar una respuesta inflamatoria en niños pretérmino. También se ha investigado, *in vitro*, el potencial patogénico de este germen para el tejido pulmonar, los ensayos se han hecho en líneas celulares de monocitos

estudiando la diferenciación de los macrófagos, la producción del factor de necrosis tumoral-alfa, IL-6, los niveles de proteínas y el ARNm, como respuesta al ***Ureaplasma urealyticum***; estos ensayos han permitido suponer que la concentración del factor de necrosis y de la IL-6 se encuentran asociados al desarrollo de la enfermedad pulmonar crónica, aunque aún no se aclara el mecanismo por el cual se produce la enfermedad pulmonar. Los datos con que se cuenta hasta la fecha, sugieren que la cascada de mediadores inflamatorios puede ser la causa del daño irreversible del tejido pulmonar, de la fibrosis o la destrucción del tejido. Los trabajos hechos en líneas celulares de ratas y de humanos, muestran que las células del hombre son más susceptibles a este germen; su patogenicidad se relaciona con su capacidad de producir fosfolipasas A y C, las cuales pueden catalizar la liberación de ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana; este ácido y sus metabolitos pueden inducir la liberación de citocinas proinflamatorias. También se informa que *in vitro* tiene la capacidad de estimular macrófagos para producir citocinas proinflamatorias, por lo que se puede considerar la hipótesis de que el ***Ureaplasma*** es un factor asociado a la enfermedad pulmonar crónica de los infantes prematuros. La etiología de la enfermedad pulmonar crónica es de índole multifactorial, encontrándose implicados en ella la inflamación de los pulmones, la sobrecarga de fluido, deficiencias nutricias e infecciones; esta última es una de las principales causas del daño pulmonar neonatal. Por eso tiene cabida la teoría de la transmisión vertical de la infección con *Ureaplasma*, como factor de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad. (12, 13, 14,15).

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE Ureaplasma y Mycoplasma

La técnica conocida por siglas en inglés como PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) ha mostrado ser una excelente herramienta para la detección en muestras clínicas de fragmentos específicos de ADN. Algunos reportes muestran que la técnica de PCR es efectiva para la detección rápida en muestras clínicas: el agente infeccioso se puede detectar en menos de 24 horas; esto es importante ya que los ureaplasmas y micoplasmas son microorganismos que presentan dificultad para ser aislados en el cultivo directo, requiriendo de 3 a 5 días para obtener resultados confiables. Los

oligonucleótidos que permiten identificar el ***Ureaplasma***, en todos sus serotipos, son: (U5) 5'-CAATCTGCTCGTGAAGTATTAC-3' y (U4) 5-ACGACGTCCATAAGCAACT-3' los cuales amplifican un fragmento de 429 pares de bases. Para confirmar su amplificación, se hace la hibridación con el oligonucleótido (U9) 5'-GAGATAATGATTATATGACAGGATCA- 3'. Se recomienda confirmar la amplificación, ya que se ha observado que las muestras en estudio pueden contener componentes inhibidores de algunos componentes de la técnica de PCR, o bien porque los oligonucleótidos pueden ser no sensibles debido a la poca cantidad del microorganismo) **(16,17)**

El diagnóstico definitivo se puede realizar mediante cultivo, requiriéndose medios como caldo urea, agar E, agar 7, agar PPLO, suplementados con extractos de levadura y suero desfibrinado de caballo, sin embargo a menudo es mucho el tiempo que se requiere para obtener el resultado **(18)**

Mycofast evolution 3: Este es un método de detección, cuantificación e identificación para ***Ureaplasma urealyticum*** y ***Mycoplasma hominis***, básicamente diseñado para aplicarse sobre muestras de secreciones endocervicales, uretrales, urinarias, gástricas y de esperma, este dispositivo también tiene la gran ventaja de que a través de él se puede determinar la susceptibilidad a antibióticos de los dos agentes antes mencionados.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA: Identifica el crecimiento de ***Mycoplasma hominis*** y ***Ureaplasma urealyticum*** después de 24 horas de incubación en medio líquido, durante su desarrollo. ***Mycoplasma hominis*** y ***Ureaplasma urealyticum*** metabolizan la urea y la arginina, respectivamente. El metabolismo de arginina por ***Mycoplasma hominis*** y la actividad de ureasa en ***Ureaplasma urealyticum*** se han sugerido como factores potenciales de virulencia (Schimke y Barile, 1963), ***Mycoplasma hominis*** genera ATP por la hidrólisis de arginina dando como productos finales CO₂ y NH₃. La liberación de amonio en grandes cantidades puede ocasionar depleción de arginina in vitro lo cual resuelta en un efecto citotóxico. La liberación de NH₃ que ocurre por ***Ureaplasma spp*** a través de la hidrólisis de urea es mediada por una ureasa muy potente. La hidrólisis de urea es el

medio predominante por el cual estos microorganismos generan ATP **(22)**. El resultando de este complejo metabolismo genera cambio de color del medio el cual contiene como indicador el rojo fenol que vira de amarillo a rojo. Este color se debe a la liberación de amoniaco al medio lo cual condiciona un pH alcalino esto permite: 1) la cuantificación de micoplasma o ureaplasma basada en la velocidad de hidrólisis de urea o arginina, la cual es proporcional al número de gérmenes contenidos en la muestra, 2) Identificación basada en el comportamiento del germen a 3 antibióticos 3) Obtener el antibiograma para ***Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* (22)**

Tradicionalmente la detección e identificación de micoplasmas y ureaplasmas urogenitales se realiza por métodos convencionales, como el cultivo bacteriológico, pruebas bioquímicas, enzimáticas y serológicas; además de técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) y sus diversas variantes, estos mismos métodos pueden ser utilizados en aspirado bronquial de neonatos para la detección de dichos agentes, sin embargo el uso de medios caldo urea y arginina sigue siendo uno de los métodos más difundidos para la detección de infección de tracto respiratorio inferior. En agudo contraste, el uso de pruebas rápidas para la detección de éstos agentes se ha difundido en los últimos años, con la finalidad de obtener un diagnóstico más precoz, sin embargo, dichas pruebas se han aplicado a muestras biológicas como: semen, secreciones cervicales, orina, pero no tenemos información de aplicación de las mismas en aspirado bronquial.

PRUEBA DE DETECCION RÁPIDA MYCOFAST EVOLUTION 3 Y TIPOS DE MUESTRAS UTILIZADAS: La prueba de detección rápida se ha utilizado en muestras biológicas de orina, semen, secreciones uretrales, endocervicales y gástricas, la composición química de cada una de ellas varía de forma considerable.

COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA ORINA

La orina normal contiene un 96% de agua y un 4% de sólidos en solución. Cerca de la mitad de los sólidos son [urea](#), el principal producto de degradación del metabolismo de las proteínas. El resto incluye [nitrógeno](#), [cloruros](#), [cetosteroides](#), [fósforo](#), [amonio](#), [creatinina](#) y [ácido úrico](#). Un litro de orina contiene normalmente agua, 10 mg de cloruro de sodio y dos productos tóxicos: la urea (25 g) y el ácido úrico (0,5 g), color ámbar, densidad 1016 a 1022, ph 4.8 a 7.4, residuo seco 55-70 g.

COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL SEMEN

Viscoso, autolicefacción a 20°C densidad de 1020-1040, aspecto blanco opalescente, ph 8.1-8.4 Peso seco 20.0-23.0 g/100 g, amoniaco de 0-4.5, lípidos proteínas, 1.58 a 1.80mg/100 ml, aminoácidos 31-56mEq/litro, cloruros 280mEq/100ml, glucosa 610mg/100ml, fósforo inorgánico 40-50mg/100ml. Colesterol, ácido láctico, fosfatasa acida y alcalina, hialuronidasa, fosforilcolina y ergotina, ácido ascórbico y espermina.

COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA SECRECIÓN VAGINAL

Color blanco, aspecto claro, consistencia altamente viscosa, ph 4.5, la secreción normal de la vagina carece de olor y microscópicamente está libre de micelios, Tricomonas vaginalis, esporas, y células guías. La muestra de fluido vaginal presenta células de descamación y abundantes Lactobacillus spp. Sin embargo hay gran variación en fluido vaginal normal y algunos síntomas asociados con las condiciones anormales de la vagina aparecen en mujeres sanas.

COMPOSICIÓN DEL JUGO GÁSTRICO

La composición del jugo gástrico depende de la actividad de las células de su mucosa. Su pH es normalmente muy bajo (1.0 a 1.5), por el HCl secretado por la mucosa. La mucosa secreta también un enzima proteolítico llamado pepsina (ya mencionado) y dos diferentes tipos de mucus: uno soluble y otro insoluble

en agua. El jugo gástrico contiene gran cantidad de agua, electrolitos (Na^+ , K^+), el factor intrínseco, al cual nos hemos referido anteriormente, y dos enzimas de cierta importancia, pero en modo alguno indispensables: la quimosina y la lipasa.

COMPOSICIÓN DE SECRECIÓN BRONQUIAL

Los principales componentes de la secreción bronquial son agua (95%), glucoproteínas ácidas (2%), lípidos (0,5-1%) y otras proteínas en menor proporción. Esta secreción se divide en tres capas:

- La más superficial o fase gel tiene, como su nombre indica, consistencia de gel, contiene la mayor parte de glucoproteínas y es transportada por el movimiento ciliar.
- La parte profunda, conocida como fase sol, está en contacto con la zona apical de las células epiteliales, es más rica en agua y contiene un tensoactivo proveniente del sistema alveolar que asegura la capacidad de deslizamiento y el efecto antiadhesivo al compararse con la fase gel.
- La más profunda formada por glucoproteínas que cumplen la función de sostén dentro de la constitución del moco.

El moco tiene unas características físicas (viscosidad, tixotropía, elasticidad y plasticidad) de las cuales la elasticidad y la viscosidad son las más importantes, que le permiten atrapar las partículas y ascender contra la gravedad. La combinación de estas propiedades determina la eficacia del transporte ciliar.

La viscoelasticidad consiste en el deslizamiento del moco para luego retornar a su forma en una posición diferente a la inicial y depende principalmente del contenido en agua y de las glucoproteínas o mucinas de elevado peso molecular. Existen tres tipos de mucinas:

- Sialomucinas: son ligeramente ácidas, ricas en grupos carboxilo.
- Sulfomucinas: son muy ácidas, ricas en grupos sulfato.
- Fucomucinas: son neutras, ricas en grupos metilo.

Estas moléculas se agregan y entrecruzan para formar una matriz tridimensional mediante diversas fuerzas: puentes de hidrógeno, enlaces

iónicos y enlaces covalentes. Los puentes de hidrógeno (débiles) determinan las propiedades viscosas; los enlaces iónicos y covalentes (más fuertes) determinan la elasticidad y la viscosidad. Cuanto más ácida es la secreción, mayor es su viscoelasticidad.

Cuando la viscosidad aumenta, la secreción mucosa encuentra mayor resistencia al desplazamiento mientras si disminuye la elasticidad, una vez estirado pierde la capacidad para retraerse y ascender. Viendo esto, podemos deducir que cuando surgen cambios en la composición y propiedades físicas del moco, esto redundará en la alteración del transporte, lo que ocurre en ciertas enfermedades de las vías respiratorias:

- La viscosidad puede verse aumentada por infección y muerte celular (esputo purulento), pues aparece un estímulo en la formación de glucoproteínas, un aumento de trasudación de proteínas plasmáticas y un aumento de ADN en el moco.
- En ausencia de infección (bronquitis crónica, asma y mucoviscidosis), la secreción es abundante y rica en sulfomucinas y en inmunoglobulinas A, que aumentan también de forma importante la viscoelasticidad y reducen la velocidad de depuración mucociliar.
- En las broncopatías crónicas obstructivas la situación es variable según el estado de la enfermedad aumentando en su inicio la viscosidad y elasticidad.
- Además, en muchas situaciones patológicas, puede existir una disfunción del movimiento ciliar debido a una alteración primaria de las células ciliares y esto predispone a las infecciones crónicas y recurrentes en múltiples sitios a lo largo del tracto respiratorio así como el desarrollo de bronquiectasias.

En este caso se evaluará la utilidad de la prueba de detección rápida en aspirado bronquial de neonatos, que en general tiene componentes muy diversos que difieren sustancialmente de otros tipos de muestras biológicas que se han utilizado como sustrato de Mycofast evolution 3, para la detección de ***Mycoplasma hominis*** y ***Ureaplasma urealyticum***.

***Mycofast Evolution 3* y los antecedentes de uso y estudios en clínica.**

Se llevó a cabo un estudio comparativo con cepas de referencia y cepas clínicas con el método en medio sólido Agar A7 y el método en medio líquido ***Mycofast Evolution 3***. Las cepas de ***U. urealyticum*** (n=29), y ***M. hominis*** (n=44) fueron probadas por separado, o como una mezcla de diferentes diluciones, de 10^3 a $\geq 10^6$ UFC /ml en agar A7. Para la cuantificación la concordancia global entre los 2 métodos es 88,4% (97,8% para la concordancia en una misma dilución) **(7)**

Para la identificación la concordancia global entre los 2 métodos es 97%, para el patrón de antibióticos. Las concentraciones muy altas $\geq 10^6$ UFC /ml de *U. urealyticum* fueron capaces de provocar cambio de color en el pozo 6 (E) **(7)**

METODOS CONVENCIONALES DE DIAGNOSTICO

La detección e identificación de micoplasmas urogenitales se realiza por métodos convencionales, como el cultivo bacteriológico, pruebas bioquímicas, enzimáticas y serológicas; además de técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa y sus diversas variantes.

CULTIVOS:

La detección de infección por *Mycoplasma* y *Ureaplasma*, se puede realizar de manera eficaz por medio de cultivo de líquidos o tejidos biológicos normalmente estériles como: sangre, LCR, líquido amniótico, tejido placentario, secreción bronquial (está última en neonatos). La naturaleza fastidiosa de estos microorganismos y la ausencia de crecimiento en cualquier medio de cultivo ordinario, son de los factores más importantes que condicionan los distintos índices de sensibilidad y especificidad reportados en la literatura, para establecer el diagnóstico de infección por éstos agentes. Aun utilizando medios de cultivo adecuados. Los cultivos siguen siendo el estándar de oro, y referencia para el diagnóstico de infección por ***M. hominis*** y

Ureaplasma spp., sin embargo, éstos, son costosos y usualmente el crecimiento lento requiriendo un mínimo de 2 a 5 días **(26)**

Los medios de cultivo para recuperar ***Mycoplasma y Ureaplasma*** a partir de muestras clínicas requiere de una gran variedad de complementos nutricionales los cuales incrementan el costo de su estudio, entre ellos se pueden mencionar: suero y factores de crecimiento (extracto de levadura, sustrato metabólico), adicionalmente se utiliza antibióticos, con la finalidad de minimizar o inhibir el crecimiento de otras bacterias. Se ha demostrado que al emplear medios de cultivo para el aislamiento de estos agentes el porcentaje de sensibilidad es variable mostrando valores menores al 70% y la especificidad de los mismos está alrededor del 90% **(27)**

Entre los medios de cultivo más utilizados se destaca el caldo y agar SP4 (pH 7,5), Agar A7. Estos fueron formulados originalmente para el cultivo de espiroplasma y es considerado el mejor medio de uso general para el crecimiento de micoplasmas. Otros son: el Medio de New York City modificado, el Sistema Trifásico (Mycotrim RS, Irvine Scientific, Irvine, Calif.), y el agar y caldo PPLO (pleuroneumonia like organism) con extracto de levadura y suero de caballo. **(27)**.

La CDC recomienda el uso de Agar A8 y A7 para detectar el crecimiento de *Ureaplasma spp.* Y Agar A8, Agar A7, Agar SP4 en el caso de ***Mycoplasma hominis*** **(27)**

Se ha observado que en estos medios bifásicos se ve favorecida la recuperación de los micoplasmas en comparación con las placas de agar. En un estudio realizado por Kenny y col. (1990), se demuestra que el uso de estos medios incrementa el aislamiento en un 26%. En cuanto al tiempo de incubación de los cultivos, ello va a depender marcadamente del inóculo inicial. Los medios de cultivo en caldo se deben incubar en atmósfera de aire a 37°C durante un tiempo máximo de cuatro semanas, inspeccionándolos diariamente para detectar cambios de color y turbidez. En general, se considera que la turbidez macroscópica y un cambio ácido o alcalino del indicador en 1-5 días se deben a contaminación bacteriana, mientras que un cambio gradual y leve del indicador del pH en 8-15 días, sin turbidez macroscópica sugiere un cultivo

verdaderamente positivo. En este caso, el caldo debe subcultivarse rápidamente en placa con un medio apropiado e incubado en cámara húmeda y atmósfera con 5% de CO₂ a 37°C durante 5-7 días, ya que a medida que se acumula más ácido en el medio los micoplasmas rápidamente se tornan no viables. Si no hay cambio de color obvio después de 1 y 3 semanas de incubación en el medio bifásico, debe realizarse un subcultivo a ciegas en medios de agar. En los medios sólidos, las colonias pueden visualizarse mediante microscopio estereoscópico en objetivo de 20X ó 60X, se observan redondas con superficies granulosas y sumergidas en el agar. **(27)**.

JUSTIFICACION

Ureaplasma y *Mycoplasma* son microorganismos que han sido implicado en enfermedades

como: sepsis, neumonía, meningitis en neonatos, que generan un elevado índice de morbilidad y mortalidad, a menudo los métodos tradicionales de diagnóstico presentan algunos inconvenientes con respecto al tiempo en que otorgan resultados(cultivos, caldo urea y arginina). La prueba de detección rápida **MYCOFAST EVOLUTION 3**, identifica el crecimiento de *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis* en 24 horas cuando se utiliza medio líquido, por lo que constituye una herramienta diagnóstica como alternativa para detección de agentes atípicos causales de infecciones de vías respiratorias bajas. Proporciona resultados de forma rápida cuando se utiliza en muestras de secreción cervicovaginal, gástrica, esperma, y por ello la importancia de probar su efectividad en muestra de aspirado bronquial de neonatos con la finalidad de obtener resultados óptimos y tempranos e iniciar tratamiento oportuno, ya que hasta el momento no se han realizado estudios en los cuales se haya utilizado esta prueba de detección rápida en muestra de aspirado bronquial para la detección de agentes atípicos.

HIPOTESIS

Si la prueba de detección rápida **Mycofast Evolution 3** ha demostrado ser un método útil para la detección de *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis* en secreciones cervicales, semen, orina, entonces sería importante evaluar su utilidad cuando se utiliza en muestras de aspirado bronquial, con la finalidad de detectar de manera rápida infecciones del tracto respiratorio inferior por estos agentes.

OBJETIVO GENERAL

- ❖ Evaluar una prueba de detección rápida para la detección de ***Ureaplasma urealyticum*** y ***Mycoplasma hominis*** en aspirado bronquial de neonatos hospitalizados Unidad de cuidados intensivos e intermedios del INPerIER.

- ❖ Comparar los resultados obtenidos al utilizar una prueba de detección rápida para ***Ureaplasma urealyticum*** y ***Mycoplasma hominis***, en aspirado bronquial, con el método convencional de diagnóstico: cultivo en Agar A7 (después de crecimiento de agentes en caldo urea y caldo arginina)

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba de detección rápida cuando se utiliza como prueba diagnóstica para detección de ***Ureaplasma urealyticum*** y ***Mycoplasma hominis***, en aspirado bronquial.

- Comparar la sensibilidad y especificidad de la prueba rápida de detección y el método convencional.

- Calcular el *valor predictivo positivo y negativo de la prueba de detección rápida* cuando se utiliza como prueba diagnóstica para detección de ***Ureaplasma urealyticum*** y ***Mycoplasma hominis***, en aspirado bronquial
- Determinar la *Significación clínica* de las infecciones de tracto respiratorio inferior por *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis*, en neonatos y la importancia de las pruebas de detección rápida como alternativa en el diagnóstico oportuna de los procesos infecciosos causados por éstos agentes.

MATERIAL Y METODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO:

Cohorte, prolectivo, transversal, comparativo

SITIO DE REALIZACIÓN:

Se llevará a cabo en Unidad de cuidados intensivos neonatales (UCIN) y unidad de cuidados intermedios neonatales (UCIREN) del Instituto nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes".

UNIVERSO DE ESTUDIO:

Todos los pacientes que ingresaron en unidad de cuidados intensivos neonatales y unidad de cuidados intermedios neonatales a partir del 1 de enero de 2008 y que estuvieran en fase III de ventilación, y con la presencia de datos clínicos de deterioro ventilatorio, después de 14 días de vida extrauterina independientemente de la edad gestacional de los pacientes y de las enfermedades adyacentes (diagnostico de ingreso), tamaño de la muestra: 17 muestras de aspirado bronquial.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- ❑ Pacientes de cualquier edad gestacional.
- ❑ Pacientes sometidos a fase III de ventilación con deterioro clínico a nivel respiratorio después de 14 días de vida extrauterina.
- ❑ Pacientes con consentimiento informado.
- ❑ Pacientes que se encuentren bajo tratamiento con macrólido al momento de la toma de muestra de aspirado bronquial. Es de Eliminación.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- ❑ Neonatos o lactantes a los que no se les pueda tomar la muestra de aspirado bronquial.

- ❑ Pacientes que se encuentren sometidos a tratamiento a base de macrólidos al momento de la toma de muestra de aspirado bronquial.
- ❑ Pacientes que hayan recibido tratamiento con macrólidos
- ❑ Muerte neonatal por causa indeterminada.
- ❑ Pacientes que se tomo la muestra y no se les realizo cultivo y solo se realizo ***Mycofast evolution 3***.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO:

- Se incluyeron en este estudio a todos los neonatos y lactantes que se encontraban hospitalizados en UCIN o UCIREN del INPerIER y ventilación mecánica con datos de deterioro ventilatorio (apnea. Necesidades elevadas de O₂, dependencia a ventilación mecánica, desaturaciones).
- Se tomo muestra de aspirado bronquial, y se coloco en un frasco estéril (técnica que se utilizaría en caso de colectar jugo gástrico u orina) para aplicar **Mycofast evolution 3**

Aspirado bronquial:

- Muestra: aspirado bronquial, transtraqueal o muestra de broncoscopia.
 - Volumen: 1 ml.
 - Recipiente: envase estéril.
-
- Como se trata de una muestra líquida se inoculará un vial conteniendo UTM, con 300 µl de líquido homogeneizado
 - El medio UTM, inoculado puede mantenerse por 8 horas a temperatura ambiente (18 a 25 °C) o 16 horas entre 2 y 8 °C
 - Preparación y almacenamiento de la muestra: Todos los reactivos están listos para usarse, los viales pueden almacenarse entre 2 y 8 °C, en su empaque original hasta la fecha de expiración.

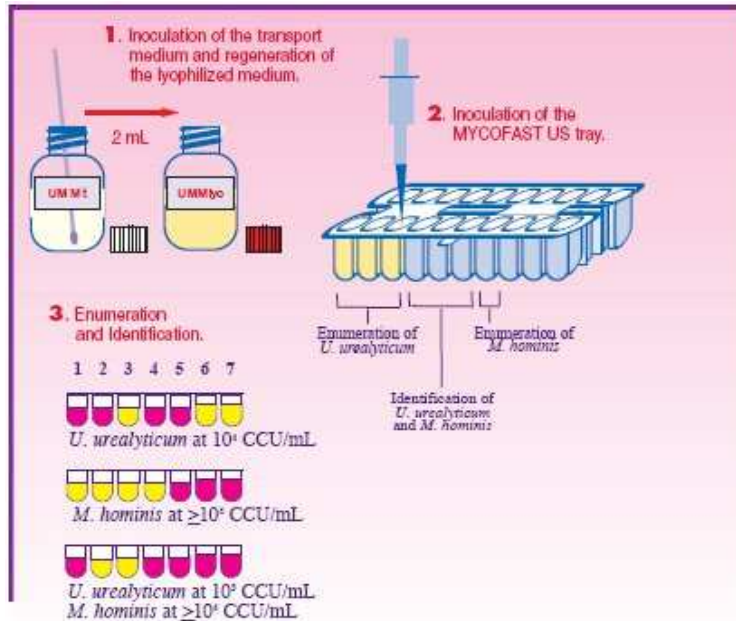
- METODO: Permitir que los reactivos alcancen la temperatura ambiente por 20 a 30 minutos.
 - Reconstitución del medio: Transferir cada medio inoculado de UMM t, en nuevo vial de UMM Iyo. El medio UMM Iyo reconstituido debe dar una coloración anaranjada
 - Inoculación en la charola: Retirar la película adhesiva y adicionar los siguientes pozos:

Pozos 1-20	100µl de UMM Iyo inoculado
Pozos 6-7	50 µl de suplemento S.Mh.
Pozos 1-20	2 gotas de aceite de parafina

- Recubrir los pozos con la película adhesiva.
- Inoculación de la charola: Incubar la charola a 37 °C ±1°C, durante 24 hrs.
- Para la cuantificación de *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis*, leer los resultados a las 24 horas.

- **LECTURA E INTERPRETACIÓN:**

- Validación: Verificar que todos los pozos de la fila estén limpios (sin turbidez), la presencia de turbidez refleja contaminación bacteriana
- Lectura e interpretación: Los resultados se leen por el color obtenido en los diferentes pozos, el resultado será positivo cuando la coloración se torne rosa a rojo (alcalinidad) o amarillo si no hubo crecimiento. Una coloración discretamente anaranjada (límite) se considera positiva



La lectura de los resultados: .

Amarillo = Negativo - **Pink** = positivos

- Identificación: Pozos 4,5 y 6: Basado en la identificación de acuerdo al cambio de color en los diferentes pozos, en este caso, las observaciones en los pozos 4,5 y 6 determinan el patrón de antibióticos: **COLOR DEL POZO #**

	4(L)	5 (SXT)	6(E)
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Rojo	Rojo	Amarillo
<i>Mycoplasma hominis</i>	Amarillo	Rojo	Rojo

- **Cuantificación: Pozos 1,2,3 y 7 : Detectar los pozos que se han tornado rojos e INTERPRETAR:**

Color rojo observado en el pozo #	Interpretación (UCC / ml)
1	U.u valor 10^3
1 y 2	U.u valor 10^4
1,2 y 3	U.u. $\geq 10^5$
7	M.h. valor $\geq 10^4$

- Prueba de susceptibilidad (pozos 8 – 20): El cambio de color del medio de los pozos conteniendo un antibiótico, indica la presencia de desarrollo bacteriano y resistencia al AB a la concentración probada. El color amarillo en el pozo indica la ausencia de desarrollo bacteriano y susceptibilidad al AB probado a dicha cierta concentración determinada.

Para hacer el estudio comparativo, la muestra de Aspirado bronquial se sembrará en caldo de urea y arginina (agregando 50 microlitros de muestra de aspirado a cada caldo) , y se incubará hasta 7 días, a 37 °C, con condiciones de CO2 al 5 al 10%, y 100% de humedad.

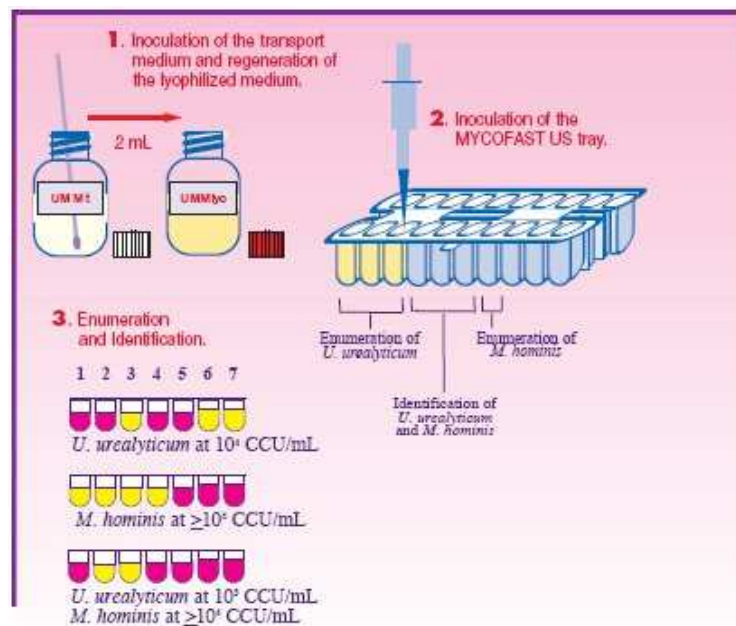
Las muestras positivas se sembraran en medio sólido para la búsqueda de colonias (Agar A7)

PRINCIPIO DE MYCOFAST EVOLUTION 3

Identifica el crecimiento de ambos agentes después de 24 horas de incubación en medio líquido. Durante el desarrollo de *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis*, metabolizan la urea o la arginina respectivamente, resultando en el cambio de color del medio, el cuál contiene como indicador el rojo de fenol, que vira de amarillo a rojo. Este color se debe a la liberación de amoniaco, resultando un pH alcalino en el medio.

El crecimiento del micoplasma permite:

1. La cuantificación de micoplasma basada en la velocidad de hidrólisis de urea o arginina, la cuál es proporcional al número de gérmenes contenidos en la muestra.
2. La identificación basada en el comportamiento del germen a tres antibióticos (patrón de antibióticos).
3. Conocer al antibiograma para microorganismos.



REACTIVOS (Descripción):

1. UMM t: vial del medio de transporte para micoplasma (3ml).
2. UMM. Iyo: vial del medio de crecimiento liofilizado (+3 ml de UMM t).

Ela charola cuenta con 20 pozos.

VARIABLES OPERACIONALES

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual	Unidad o escala de medición
Edad	Cuantitativa discreta Independiente	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento de un individuo	Años
Peso	Cuantitativa continua Independiente	Es la medida de la fuerza que ejerce la gravedad sobre un cuerpo. En su uso cotidiano, el término "peso" se utiliza a menudo como sinónimo de masa . cantidad de materia contenida en un cuerpo	Gramos (grs.)
Edad Gestacional	Cuantitativa continua Independiente	Tiempo trascendido de una gestación humana, que dura por término medio 40 semanas (280 días) desde la fecha de última regla	Semanas de Gestación
Escala de Ballard	Cuantitativa continua Independiente	Método clínico postnatal de cálculo de edad gestacional que consiste en la observación de una serie de características físicas a partir de las cuales se asigna una puntuación determinada	Semanas
Apgar	Cuantitativa discreta Independiente	Evaluación del estado general del recién nacido de acuerdo a cinco parámetros, a los cuales se les asigna una puntuación cuya	

		suma da el resultado.	
Sexo	Cualitativa dicotómica independiente	Género, define de forma psicosocial los diferentes estados sexuales	Femenino Masculino
Variable	Tipo de variable	Definición conceptual	Unidad o escala de medición
Neumonía atípica	Cualitativa independiente	Es la infección del parenquima pulmonar causada por ciertas bacterias como: Legionella pneumophila, Micoplasmas, Chlamydophila, donde existe una disociación clínico radiológica. •	radiología
Cultivo	Cuantitativa independiente	Son medios indefinidos o naturales y en su preparación siempre se incluye algún extracto de composición química desconocida. El más utilizado, el caldo común o su versión solidificada con agar, es un medio que permite el crecimiento de la mayoría de las bacterias que se van a utilizar	

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Se efectuó estadística utilizando medidas de tendencia central ,
coeficiente
de kappa y la prueba de McNemar

RECURSOS HUMANOS:

- 1 investigador residente
- 1 asesor clínico y metodológico
- 1 asesor microbiológico

RECURSOS MATERIALES:

- Asas de inoculación, mechero de Bunsen.
- Matraces Erlenmeyer.
- Vasos de precipitado.
- Tubos de ensayo tapón rosca de 16 x 150 mm y de 16 x 125 mm.
- Cajas de Petri.
- Pipetas Pasteur.
- Gradillas.
- Hisopos estériles.
- Incubadora.
- Jarra de incubación de CO₂.
- Marcadores.
- Cánula de aspirado.
- Recipiente estéril.
- **Kit Mycofast evolution 3**

RESULTADOS:

En el periodo comprendido de Enero del 2008 a Julio del mismo año se obtuvieron 17 muestras de aspirado bronquial de pacientes hospitalizados en la UCIN y UCIREN del INPerIER.

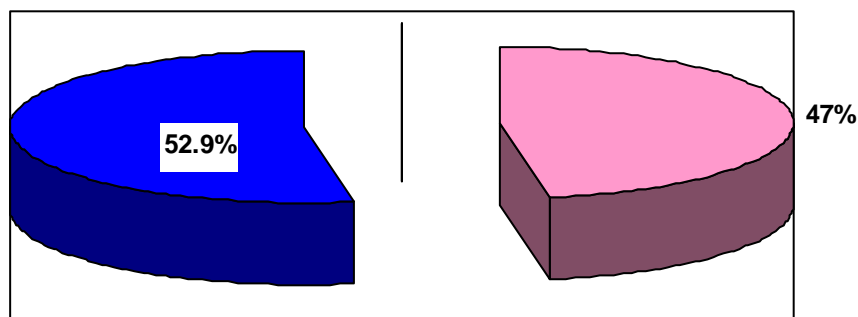
En este estudio se analizaron un total de 17 muestras de recién nacidos de este instituto.

Del total de estas muestras 8 (47.1%) se recolectaron en pacientes del sexo femenino y el 9 (52.9%) del sexo masculino (Tabla I y Gráfica 1).

TABLA I. DISTRIBUCION POR SEXO

Género	Número pacientes	Porcentaje
Femenino	8	47,1%
Masculino	9	52,9%
TOTAL	17	100%

Gráfica 1. División de pacientes por género

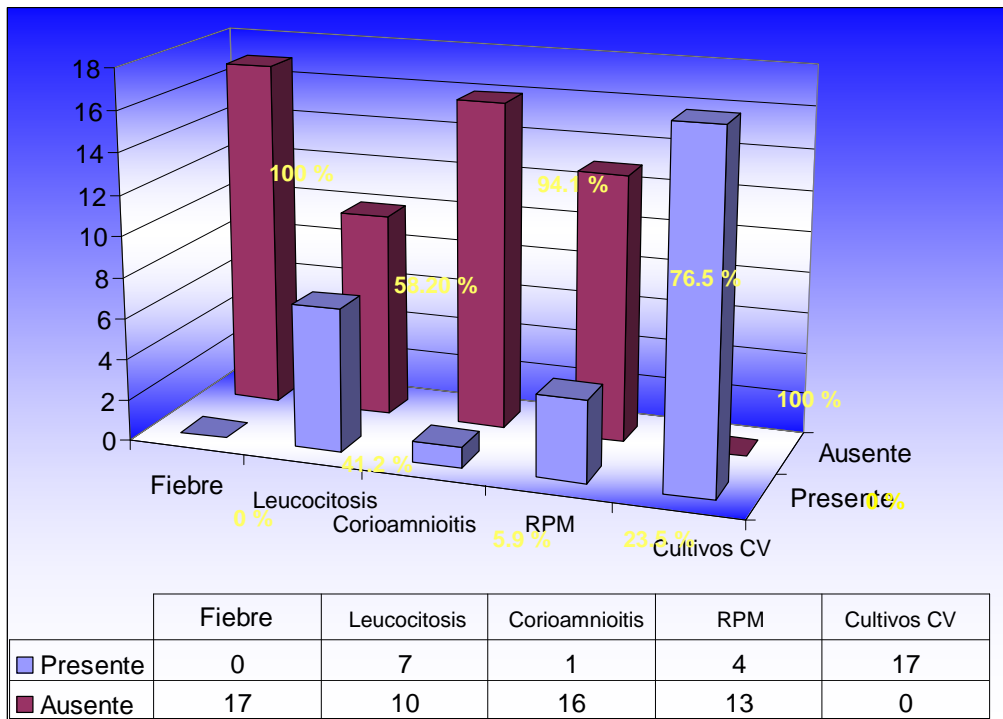


En los antecedentes maternos perinatales, se reporto 7 (41.2%) de las madres presentaron leucocitosis, 1 (5.9%) presento corioamnioitis y el 4(23.6%) ruptura prematura de membranas, a 17 (100%). (Tabla II y Gráfica 2).

TABLA II. ANTECEDENTES MATERNOS PERINATALES

Hallazgo	Número de pacientes	Porcentaje
Fiebre	0	0%
Leucocitosis	7	41,2%
Corioamnioitis	1	5,9%
RPM	4	23,5%
Cultivos CV	17	100%

Gráfica 2: Antecedentes maternos perinatales



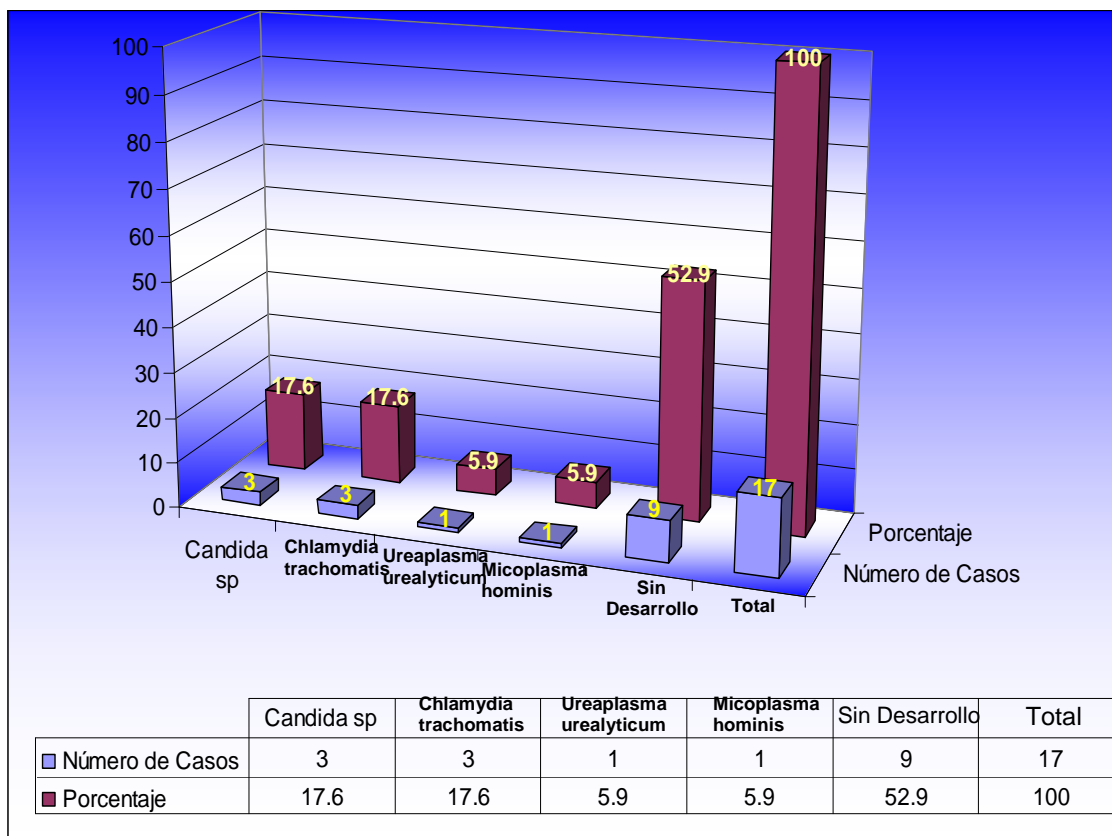
Los microorganismos aislados en estos cultivos fueron: igual para ***Cándida sp.*** y ***Chlamydia trachomatis*** 3 casos (17,6%), ***Ureaplasma urealyticum*** en 1 caso (5,9%), ***Mycoplasma hominis*** en 1 caso (5,9%) y en 9 cultivos no se obtuvo desarrollo (52,9%) (TABLA III y Gráfica 3).

TABLA III. MICROORGANISMOS DETECTADOS EN CULTIVOS CERVICOVAGINALES MATERNOS.

Microorganismo	Número de casos	Porcentaje
<i>Cándida sp.</i>	3	17,6%
<i>Chlamydia trachomatis</i>	3	17,6%
<i>Ureaplasma</i>	1	5.9%

<i>urealyticum</i>		
<i>Micoplasma hominis</i>	1	5,9%
Sin desarrollo	9	52,9%
TOTAL	17	100 %

Gráfica 3: Microorganismos detectados en cultivos cervicovaginales maternos.

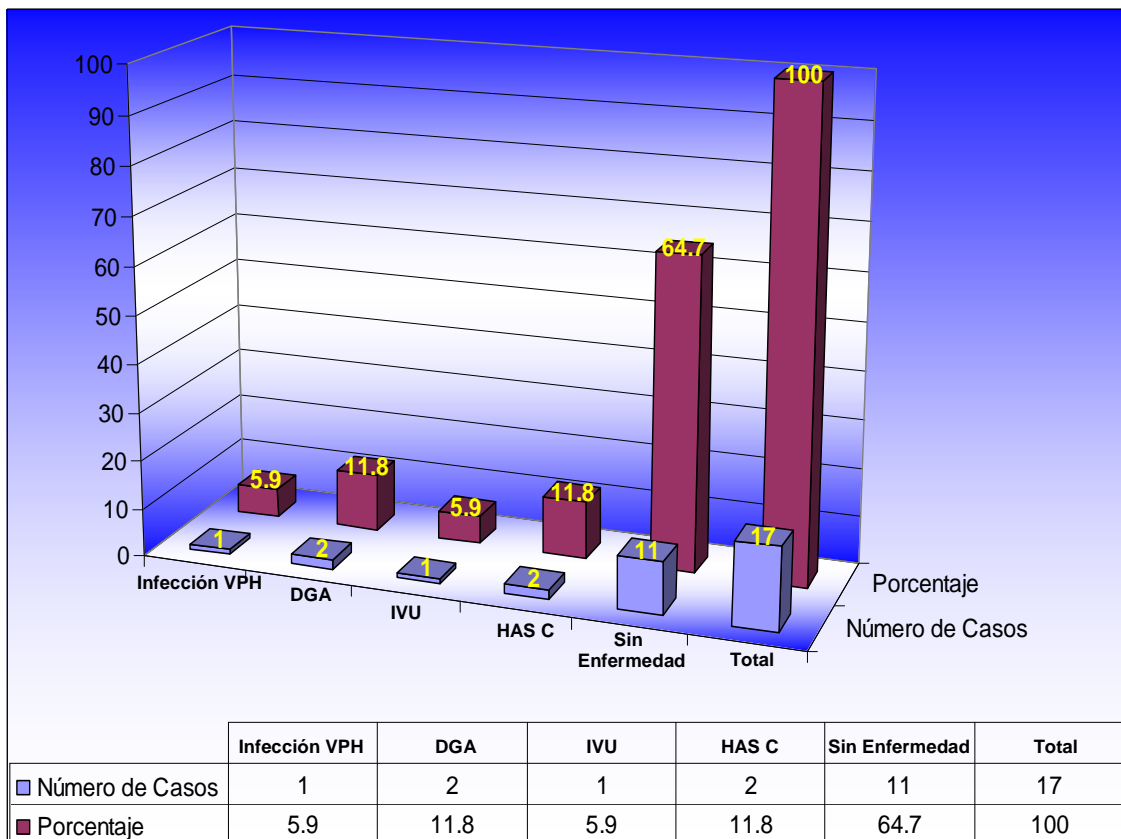


La patología materna detectada fue la siguiente 1 (5.9%) caso se reporto infección por virus del papiloma humano (VPH)1 (5.9%) caso infección de vías urinarias, 2 (11.8%) casos diabetes gestacional (DGA) e hipertensión arterial sistémica crónica (HASC). (TABLA IV y Gráfica 4).

TABLA IV. ENFERMEDADES MATERNAS

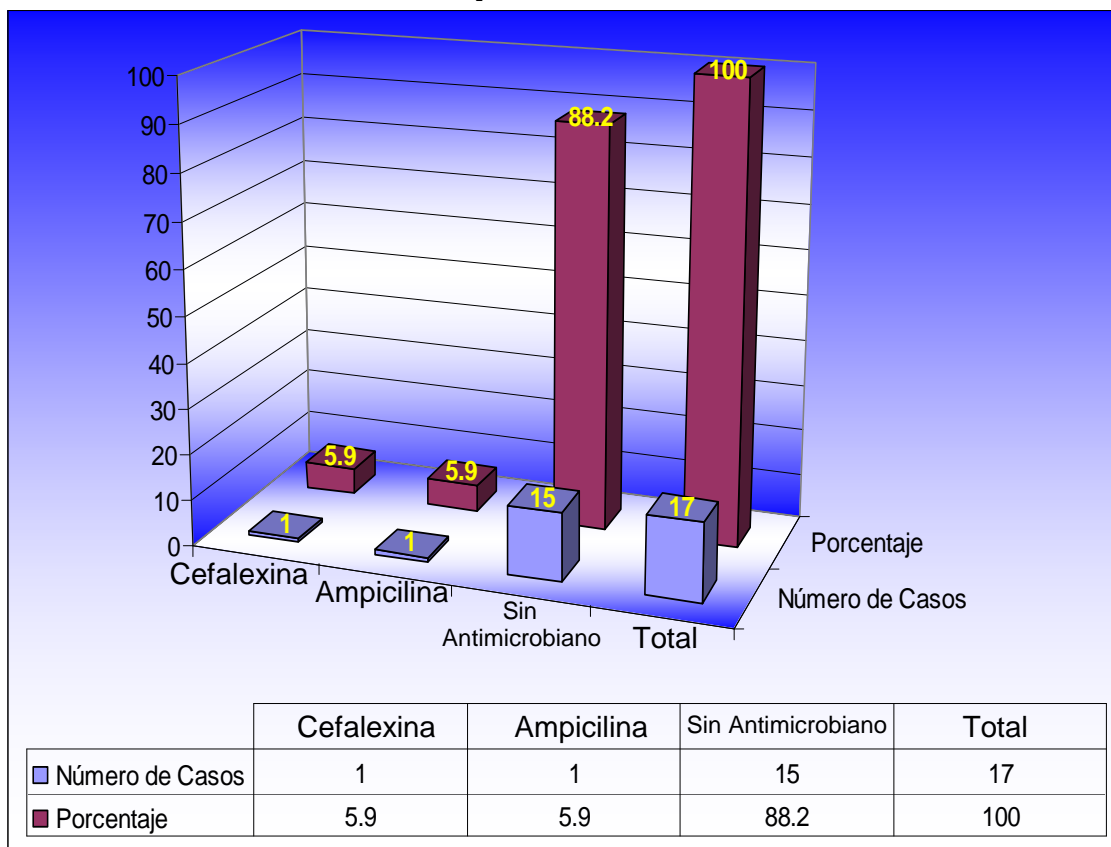
Enfermedad	Número de pacientes	Porcentaje
Infección VPH	1	5,9%
DGA	2	11,8%
IVU	1	5,9%
HAS C	2	11,8%
Sin enfermedad	11	64,7%
TOTAL	17	100%

Gráfica 4: Enfermedades maternas



El 2(11.8%) de las madres de los pacientes recibieron manejo antimicrobiano antes de la resolución del embarazo con ampicilina y cefalexina (Gráfica 5).

Gráfica 5: Uso de antimicrobianos en madres de los pacientes

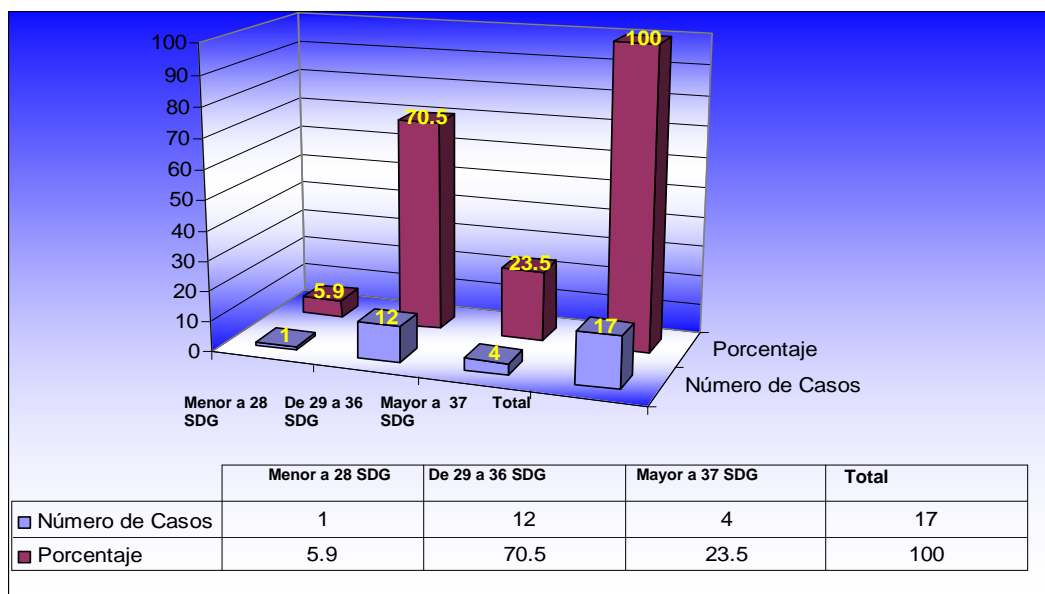


La edad gestacional del grupo estudiado predominó la edad de 29-36 sdg, con un 12 (70.5%) y el peso promedio fue de 2.200 gramos. (TABLA V y Gráfica 6).

TABLA V. EDAD GESTACIONAL DE LOS PACIENTES

Edad gestacional	Número de casos	Porcentaje
Menor a 28 SDG	1	5,9%
De 29 a 36 SDG	12	70,5%
Mayor a 37 SDG	4	23,5%
TOTAL	17	100%

Gráfica 6: Edad gestacional de los pacientes



Las manifestaciones clínicas que presentaron los neonatos fueron las siguientes: En 17 (100%) casos taquipnea y alteración del patrón respiratorio, y 14 (82.4%) alteraciones de la frecuencia cardiaca 14 (82.4%) distermias 7 (41.2%) y cambios vasomotores 10 (58.2%). (Tabla VI y Gráfica 7)

TABLA VI. MANIFESTACIONES CLINICAS NEONATALES

Manifestaciones clínicas	Número de casos	Porcentaje
Taquipnea	17	100%

Alteración del patrón respiratorio	14	82.4%
Alteración de la frecuencia cardiaca	14	82.4%
Distermias	7	41.2%
Cambios vasomotores	10	58.2%

El uso de esquemas antimicrobianos utilizados en los pacientes previo a la toma del aspirado bronquial fue el siguiente en 6 (35.4%) casos ampicilina y amikacina, y en 5 casos (29.5%) cefotaxima, ningún caso recibió previamente antimicrobianos del tipo de macrólidos.

En los 17 (100%) casos se encontraron alteraciones radiológicas principalmente patrón de afección intersticial.

En las 17 muestras de aspirado bronquial procesadas, no hubo crecimiento de *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis* en ninguno de los medios convencionales (caldo urea y caldo arginina) la prueba de detección rápida (Mycofast evolution 3) en todos los casos fue negativa, al no obtener aislamiento microbiológico no se pudo efectuar cultivo en medio Agar A7. (TABLA VII).

TABLA VII RESULTADO DE ASPIRADO BRONQUIAL

No. Paciente	<u>Myofast Evolution 3</u> a las 24 h	Caldo urea a los 7 días	Caldo arginina a los 7 días	Agar A7
1	Negativo	Negativo	Negativo	No se efectuó
2	Negativo	Negativo	Negativo	No se

				efectuó
3	Negativo	Negativo	Negativo	No se efectuó
4	Negativo	Negativo	Negativo	No se efectuó
5	Negativo	Negativo	Negativo	No se efectuó
6	Negativo	Negativo	Negativo	No se efectuó
7	Negativo	Negativo	Negativo	No se efectuó
8	Negativo	Negativo	Negativo	No se efectuó
9	Negativo	Negativo	Negativo	No se efectuó
10	Negativo	Negativo	Negativo	No se efectuó
11	Negativo	Negativo	Negativo	No se efectuó
12	Negativo	Negativo	Negativo	No se efectuó
13	Negativo	Negativo	Negativo	No se efectuó
14	Negativo	Negativo	Negativo	No se efectuó
15	Negativo	Negativo	Negativo	No se efectuó
16	Negativo	Negativo	Negativo	No se efectuó

17	Negativo	Negativo	Negativo	No se efectuó
----	----------	----------	----------	---------------

DISCUSIÓN

Ureaplasma y ***Mycoplasma*** son microorganismos implicados en enfermedades neonatales y maternas lográndose a través del tiempo avances en su conocimiento, Existen estudios de la colonización de *Ureaplasma urealyticum* en la superficie coriónica de la placenta, estudios de infecciones respiratorias y del sistema nervioso central (SNC) por ***M. hominis*** en recién nacidos que adquirieron la infección en el canal del parto.

En nuestro estudio encontramos que el 23.4% presentaron ruptura de membranas corioamnióticas y 76.4% prematuridad, en investigaciones realizadas estos factores se han vinculado con participación de estos microorganismos como causantes de infección respiratoria y del sistema nervioso central, debido a las repercusiones que tienen estos microorganismos y las secuelas, considerando de alto riesgo a estos pacientes decidimos utilizar Mycofast como alternativa de detección temprana además de que es una prueba de detección rápida fundamentada en diversos estudios y con una alta especificidad y sensibilidad para detectar a estos microorganismos en otros fluidos.

Aunque sabemos que en México la infección predominante es por *Chlamydia trachomatis*, los estudios que se han realizado en nuestro Instituto en la clínica de ITS reporto en mujeres no embarazadas un 21.5% de recuperación de micoplasmas en 1989, otro estudio realizado en 1995 reporto el 3.9%, dentro de los factores de riesgo para la presencia de estos microorganismos en las madres de los pacientes ninguna tuvo factores de riesgo aparente como son el uso de dispositivos y parejas múltiples, estos microorganismos pueden producir corioamnioitis encontrando en nuestro estudio solo en el 5.9%.

Existen estudios de mujeres embarazadas, en México y ambos agentes se han encontrado como causa de infección cervical alrededor del 25%, aunque la infección cervical con *C. trachomatis*, es relevante la detección temprana de los micoplasma.

Otro parámetro que nos permitió seleccionar y aplicar inicialmente Mycofast sin tener el resultado del estándar de oro fueron los cambios radiológicos los cuales nos orientaban a sospechar la presencia de microorganismos atípicos, ya que es característico el patrón intersticial, prematuridad, las manifestaciones de neumonía son inespecíficas, pero nuestros hallazgos concuerdan con los encontrados en la literatura como son taquipnea se presentó en el 100% de nuestros pacientes alteración del patrón respiratorio en 82.4% los resultados de laboratorio obtenidos fueron inespecíficos, al igual que se refiere en la literatura.

El cultivo de aspirado bronquial ha sido una herramienta valiosa sin embargo, el uso de nuevos dispositivos para efectuar un diagnóstico rápido y oportuno nos permite iniciar un tratamiento en forma precoz en pro del bienestar de los neonatos, el cultivo de caldo urea y caldo arginina es el estándar de oro para el diagnóstico pero uno de sus inconvenientes es el tiempo que se requiere para valorar la presencia de estos microorganismos (7 días) y sin embargo el fundamento bioquímico de Mycofast evolution 3 lo realiza en 24 horas conociendo de la alta sensibilidad y especificidad de Mycofast para la detección en diversos fluidos y conociendo los estudios realizados como este estudio comparativo con cepas de referencia y cepas clínicas con el método en medio sólido Agar A7 y el método en medio líquido **Mycofast Evolution 3**. Las cepas de *U. urealyticum* (n=29), y *M. hominis* (n=44) fueron probadas por separado, con una mezcla de diferentes diluciones, de 10^3 a $\geq 10^6$ UFC /ml en agar A7. Para la cuantificación la concordancia global entre los 2 métodos es 88,4% (97,8% para la concordancia en una misma dilución), analizamos la composición química de los diferentes fluidos encontrando que es utilizado con diferentes pH y composiciones y que estos aspectos no son limitantes para el aislamiento, tomando nosotros como prueba de seguridad el estándar de oro que fue el caldo urea y arginina resultando negativo en todos los casos al igual

que Mycofast, con los valores obtenidos de las observaciones se les realizó el coeficiente de kappa el cual fue 0.17 lo que nos traduce que la concordancia es inadecuada y puede ser debida al azar.

En nuestro estudio ni el caldo urea/arginina tuvo desarrollo, ni Mycofast, y el Agar 7 no se realizó por lo que no se pueden establecer comparaciones, la sensibilidad y especificidad no se pudo calcular debido a que no obtuvimos ningún resultado positivo.

Al realizar la prueba de McNemar se reporta que no hay diferencia estadística significativa entre ambos métodos por lo que los dos pueden ser igualmente efectivos para la detección de micoplasmas en aspirado bronquial.

CONCLUSIONES:

En nuestra investigación los resultados fueron negativos puede ser que exista una diferencia que no se pudo detectar quizás por un número insuficiente de sujetos, por lo que se dice no tuvo el suficiente poder o potencia, pero a pesar de esto no dudamos de la efectividad de Mycofast y sugerimos continuar realizando estudios de investigación de tipo prospectivo y no descartar el uso en secreción bronquial, aunque es necesario que se apoye con mayor número de estudios así como de muestra.

BIBLIOGRAFIA:

1. Faro S, Martens M, Maccato M, Hammil H, Pearlman M.: *Vaginal flora and pelvic inflammatory disease*. Am J Obstet Gynecol. 1993; 169: 470–473.
2. Taylor-Robinson D. Infections due to species of Mycoplasma and Ureaplasma: an update. Clin Infect Dis 1996; 23: 671-684.
3. Remington JS. Infectious Diseases Of The Fetus And Newborn Infant by Jack S. (2000).
4. Freundt EA. Cultural media for classic mycoplasmas and ureaplasmas. En: Tully JG, Razin S, ed. Methods in Mycoplasmaology. New York: Academic Press, Inc; 1983. p. 127-46.
5. Casalta JP, Piquet P, Alazia M, Guidon AC, Drancourt M, Raoult D. Mycoplasma pneumoniae pneumonia following assisted ventilation. Am J Med 1996; 101(2) :165-169.
6. Wescor. Mycofast EE.UU. urogenital Mycoplasma diagnóstico del Discovery, el distribuidor canadiense de Wescor del Mycofast EE.UU.
7. Grattard F., Soleihac B., De Barbeyrac B., Bebear C., Seffert P. Pozzetto B. Epidemiologic and molecular investigations of genital mycoplasmas from women and neonates at delivery. Pediatr. Infect. Dis. J. 1995;14 : 853-858.
8. Pereyre S, Bebear CM, Bebear C. Les mycoplasmes en pathologie humaine. Revue Française des Laboratoires. Supplément au 2001 (329)34-36.
9. Ramírez IC, Casanova R G, Coordinador, Menocal TG, Ortiz IF. Prevalencia de la infección cervicovaginal por *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* en pacientes ginecológicas del Instituto Nacional de Perinatología. Enfermedades Infecciosas y Microbiología. 2004; 24: 114-11

10. Remington J, Klein J, Baker C, Wilson C. Infectious diseases of the fetus and the newborn infant. 2006: 6 ed. 1545-78
11. Kotecha S, Wilson L, Wangoo A, Silverman M, Shaw RJ. Increase in interleukin (IL)-1 beta and IL-6 in bronchoalveolar lavage fluid obtained from infants with chronic lung disease of prematurity. *Pediatr Res* 1996; 40: 250-6.
12. Tullus K, Noack GW, Burman LG, Nilsson R, Wretling B, Brauner A. Elevated cytokine levels in tracheobronchial aspirate fluids from ventilator treated neonates with bronchopulmonary dysplasia. *Eur J Pediatr* 1996; 155: 112-6.
13. Ozdemir A, Brown MA, Morgan WJ. Markers and mediators of inflammation in neonatal lung disease. *Pediatr Pulmonol* 1997; 23: 292-306.
14. De Dooy JJ, Mahieu LM, Van Bever HP. The role of inflammation in the development of chronic lung disease in neonates. *Eur J Pediatr* 2001; 160: 457-63.
15. Jonson B, Tullus K, Brauner A, Lu Y, Noack G. Early increase of TNF alpha and IL-6 in tracheobronchial aspirate fluid indicator of subsequent chronic lung disease in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1997; 77: F198-F201.
16. Cassell GH, Waites KB, Crouse DT, Rudd PT, Canupp KC, Stagno S, Cutter GR. Association of *Ureaplasma urealyticum* infection of the lower respiratory tract with chronic lung disease and death in very-low-birth-weight infants. *Lancet* 1988; 2: 240-5.
17. Crouse DT, Odrezin GT, Cutter GR, Reese JM, Hamrick WB, Waites KB, Cassell GH. Radiographic changes associated with tracheal isolation of *Ureaplasma urealyticum* from neonates. *Clin Infect Dis* 1993; 17(Suppl. 1): S122-S30.
18. Abele-Horn M, Peters J, Genzel-Boroviczeny O, Wolff C, Zimmermann A, Gottschling W. Vaginal *Ureaplasma urealyticum* colonization: influence on pregnancy outcome and neonatal morbidity. *Infection* 1997; 25: 286-91.

19. Naessens A, Foulon W, Breynaert J, Lauwers S. Serotypes of *Ureaplasma urealyticum* isolated from normal pregnant women and patients with pregnancy complications. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 319-22.
20. Quinn PA, Rubin S, Nocilla DM, Read SE, Chipman M. Serological evidence of *Ureaplasma urealyticum* infection in neonatal respiratory disease. *Yale J Biol Med* 1983; 56: 565-72.
21. Tully JG. Current status of the *Mollicutes* flora of humans. *Clin Infect Dis* 1993; 17(Suppl. 1): S2-S9.
22. Schimke RT, Barile MF. Arginine metabolism in pleuropneumonia-like organisms isolated from mammalian cell culture. *J Bacteriol.* 1963. Aug; 86: 195-206.
23. Gerard J, Tortora RS Principios de anatomía y fisiología. Ed. Oxford University Press, novena edición.
24. Stevens Alan, James Lowe Histología humana Ed. Harcourt, segunda edición.
25. Córdova, Mercado M, Manual de fisioterapia respiratoria Ed. Masson Ergon, segunda edición
26. Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and Ureaplasmas as Neonatal Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews.* 2005;18: 757–789.
27. Waites, K. B., C. M. Bebear, J. A. Robertson, D. F. Talkington, and G. E. Kenny (ed.). 2001. Cumitech 34: laboratory diagnosis of mycoplasmal infections. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

ANEXO I:

HOJA DE CAPTACION DE DATOS :

I.- FICHA DE IDENTIFICACIÓN:

Nombre del paciente: _____ Fecha: _____
Registro: _____ Edad: _____ Fecha de nacimiento: _____ Sexo _____
Domicilio: _____ Teléfono: _____

II.- HISTORIA PERSONAL :

1. Numero de gestación : _____
2. Edad gestacional: _____
3. Talla: _____
4. Peso: _____
5. Apgar: _____
6. Silverman: _____
7. Patología neonatal: _____
8. Patología infecciosa: _____
9. Días de ventilación mecánica: _____

III. RESULTADOS OBTENIDOS:

1. Resultado Mycofast evolution 3 Identificación: _____
2. Resultado Mycofast evolution 3 cuantificación: _____
3. Resultado Mycofast evolution 3 Susceptibilidad: _____

IV. Otros resultados:

1. Resultado caldo urea _____
2. Resultado Caldo arginina _____
3. Cultivo en Agar A7 _____
4. Cultivos CV maternos _____