



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina División de Estudios de Posgrado Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes"

Frecuencia de identificación por cultivo caldo específico
y reacción en cadena de la polimerasa punto final de
Ureaplasma urealyticum en líquido cefalorraquídeo
de recién nacidos del
Instituto Nacional de Perinatología

T e s i s

Que para obtener el Título de:
Especialista en Infectología

P r e s e n t a
Dr. Jorge Rafael Gamboa Cardeña

Profesor titular del curso de especialización
Dr. Enrique Segura Cervantes

Director de tesis
Dr. Jesús Reyna Figueroa

Co-Director de tesis
M. en C. Saúl Flores Medina



MÉXICO, D.F. FEBRERO 2010



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.

AUTORIZACIÓN DE TESIS

Dr Salvador Gaviño Ambriz
Director de Enseñanza

Dr. Enrique Segura Cervantes
Profesor Titular del curso de Infectología

Dr. Jesús Reyna Figueroa
Director de Tesis

AGRADECIMIENTOS

A mi Esposa y Padres

ÍNDICE

1. MARCO TEÓRICO	
1.1 Introducción	
1.2 Planteamiento del Problema	1
1.3 Pregunta de investigación	10
1.4 Justificación	11
1.5 Objetivo general	12
1.6 Objetivo específico	13
	14
2. MATERIAL Y MÉTODOS	
2.1 Diseño del estudio	
2.2 Universo	15
2.3 Muestra	15
2.4 Criterios de inclusión	15
2.5 Criterios de exclusión	16
2.6 Tamaño de la muestra	16
2.7 Métodos de recolección y análisis estadístico	17
2.8 Descripción general del estudio y procedimientos de laboratorio	17
a. Cultivo en medio líquido para el diagnóstico de infección por <i>U. urealyticum</i>	
b. Extracción de ADN de líquido cefalorraquídeo para el diagnóstico de infección <i>U. urealyticum</i>	
c. Amplificación del ADN por reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de infección por <i>U. urealyticum</i>	
3. RESULTADOS	20
4. DISCUSIÓN	22
5. CONCLUSIONES	23
6. REFERENCIAS	24
7. ANEXOS	29

RESUMEN

La incidencia de meningitis bacteriana es mayor durante el período neonatal que en cualquier otro período de la vida, en éste grupo etario la tasa de ataque es del 1%, los microorganismos bacterianos asociados son el *Streptococo del grupo B*, *Enterococcus sp*, *Streptococcus viridians*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa negativo*, *Listeria monocitogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*; entre el grupo de los mycoplasmas genitales se encuentra el *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum*^{1,2}. Éste último es un microorganismo capaz de invadir el sistema nervioso central de los recién nacidos, que también es un agente productor de infecciones de transmisión sexual con tasas de colonización vaginal del 40 al 80%⁴. El *U urealyticum* en el embarazo se ha asociado a prematuridad, bajo peso al nacimiento, neumonía neonatal e infecciones en sistema nervioso central. Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue determinar la frecuencia en la que dos pruebas diagnósticas, el cultivo en medio líquido (caldo urea) específico y la reacción en cadena de la polimerasa de punto final, identificaban *Ureaplasma urealyticum* en muestras de líquido cefalorraquídeo en recién nacidos hospitalizados en las unidades de terapia intensiva e intermedia del INPer. Las muestras de líquido cefalorraquídeo fueron sembradas en caldo urea y otra parte se empleó para la extracción de DNA con la técnica fenol-cloroformo. El DNA obtenido se amplificó inicialmente empleando iniciadores universales para la detección de género (*Ureaplasma/Mycoplasma*), enseguida las muestras positivas se amplificaron usando iniciadores especie-específico. Los resultados de la primer fase mostraron que de las 37 muestras de líquido cefalorraquídeo, 3 fueron positivas por cultivo con caldo urea y otras 3 por reacción de la cadena de la polimerasa punto final, que corresponden al 16% de las muestras. La concordancia entre las pruebas resultó 0.2, es decir baja. Las muestras habían sido obtenidas en su mayoría (89%) de pacientes con alteraciones clínicas y/o de laboratorio sugestivas de sepsis, no presentaban alteraciones en el citoquímico de líquido cefalorraquídeo. En los recién nacidos con sepsis sin aislamiento microbiológico y que presenten evolución tórpida el uso de técnicas como el cultivo en medio líquido específico y/o PCR tiempo final podrían ser útiles para descartar la infección en sistema nervioso central provocadas por *Ureaplasma urealyticum*.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Introducción

En el año de 1898 Nocard y Roux describieron a los micoplasmas, demostrando que la pleuroneumonía en ganado vacuno era causada por organismos que pasan filtros que retenían bacterias. Estos investigadores desarrollaron un medio de agar enriquecido que soportaba el crecimiento colonial de estos microorganismos. Las colonias de los micoplasmas no son iguales al resto de las bacterias, presentan un centro denso debido al crecimiento dentro del agar y crecimiento poco denso en las zonas periféricas, con un diámetro de 300 μm ; Además requieren un medio de cultivo rico con ácidos nucleicos precursores.

Los micoplasmas son los organismos autorreplicativos más pequeños en términos de dimensiones celulares y tamaño del genoma, el cual varía entre 570 y 2 200 pares de bases; sus limitados mecanismos biosintéticos son responsables de muchas de sus características biológicas y de sus complejos requerimientos para el crecimiento en medios de cultivo *in vitro*.

Los micoplasmas pertenecen a la familia *Mycoplasmataceae* y requiere de colesterol para su crecimiento, algunos hidrolizan urea, oxidan ácidos grasos de cadenas cortas a través de la beta-oxidasa o degradan azúcares durante sus procesos glucolíticos. Estos microorganismos no sintetizan peptidoglucano y la carencia de una pared celular confiere a las células un pleomorfismo que impide la tinción por Gram y les otorga una resistencia intrínseca a algunas familias de antibióticos. Están delimitados por una triple capa o "unidad de membrana" que contiene un esterol (los micoplasmas requieren la adición de suero o el colesterol al medio para producir esteroides para su crecimiento). Además, son susceptibles a la deshidratación, por lo que están limitados a una existencia parasitaria en asociación con otras células eucariotas de sus huéspedes; por lo tanto no es posible clasificarlos como cocos o bacilos

Los géneros *Mycoplasma* y *Ureaplasma* en asociación predominan en los tractos respiratorio y urogenital: muy pocas veces penetran en la submucosa, excepto en caso de inmunosupresión.

Mycoplasma hominis y *Ureaplasma urealyticum* se han registrado como flora comensal en 40% de la población humana asintomática y en ciertas circunstancias estos organismos se multiplican considerablemente y se han aislado con frecuencia en pacientes con cervicitis, sepsis, neumonía, meningitis y artritis séptica, enfermedad inflamatoria pélvica, vaginosis, prostatitis, pielonefritis, cálculos renales e infertilidad, y también en patologías obstétricas; como nacimientos prematuros, ruptura prematura de las membranas, abortos, corioamnionitis, fiebre postparto e infecciones neonatales.

Estos microorganismos se han encontrado en estudios de autopsia, en vísceras y cerebros de niños recién nacidos, de los que 50% presentaba malformaciones congénitas. Unos informes sugieren que *Ureaplasma* ejerce efectos teratogénicos en la etapa fetal. Otros estudios indican que es posible asociar la colonización por *Ureaplasma urealyticum* en la superficie coriónica de la placenta, con la morbilidad y mortalidad perinatal, con nacimientos prematuros y con el desarrollo de enfermedad pulmonar crónica en infantes de bajo peso al nacer¹⁻⁶

Ureaplasma urealyticum fue aislado de manera inicial en hombres con uretritis no gonocócica en 1954. Alguna vez fue denominado como cepa T de los micoplasmas por sus dimensiones (20-30µm de diámetro). Es un comensal frecuentemente aislado en el tracto genital inferior en mujeres sexualmente activas, la tasa de colonización va del 40 al 80%. En nuestro país se ha reportado una tasa de aislamiento del 31%. La tasa de transmisión de la madre colonizada al neonato es variable y va del 8.5% en niños de término y en el prematuro del 58%, la tasa de transmisión vertical no se ve afectada por el tiempo de ruptura de membranas ni la vía de obtención.¹⁻⁸

La transmisión materno-fetal se puede producir por tres rutas:

Infección intrauterina por vía ascendente en la que los organismos acceden a la bolsa amniótica, multiplicándose ahí y pasando posteriormente al pulmón fetal.

Transmisión hematogena a través de la placenta y las venas umbilicales. La infección puede provocar corioamnionitis, diseminación a los órganos fetales y neumonía congénita.

Colonización de la piel, membranas mucosas y tracto respiratorio al pasar a través del canal de parto.

La infección se asocia a prematurez, debido a que la infección del líquido amniótico resulta en una corioamnionitis, fuertemente relacionada con ruptura prematura de membranas. Lo anterior dio origen a una considerable cantidad de investigaciones que tratan acerca de la infección por *Ureaplasma urealyticum* en el recién nacido durante la década pasada. La infección se ha relacionado con bacteremia, neumonía, enfermedad pulmonar crónica, invasión del sistema nervioso central, reportes de meningitis, hemorragia intraventricular e hidrocefalia, artritis séptica y osteomielitis y prematurez¹⁻¹².

Previo a 1986, no existían reportes de aislamiento de *U. urealyticum* en sistema nervioso central. A partir de esta fecha el *U. urealyticum* ha sido uno de los agentes más comúnmente aislados en líquido cefalorraquídeo en niños con sospecha de sepsis y meningitis. Los reportes de aislamientos de *U. urealyticum* en muestras líquido cefalorraquídeo o tejido cerebral, ocasionando meningitis, hemorragia intraventricular e hidrocefalia; son ocasionales y cada vez más frecuentes, resultado probablemente de una infección *in utero* trasplacentaria, por vía ascendente o durante el parto. Durante el seguimiento de éstos pacientes se ha reportado en algunos de ellos alteraciones como hemiplejía, cuadriplejía espástica, hidrocefalia y retraso en el neurodesarrollo¹⁻¹².

Los hallazgos en el citoquímico del líquido cefalorraquídeo consisten en la presencia de polimorfonucleares o mononucleares, hipoglucoorraquia, elevación de proteínas, además de la presencia de hidrocefalia progresiva y hemorragia intraventricular en recién nacidos pretérmino. En algunos pacientes, los organismos son erradicados espontáneamente del líquido cefalorraquídeo, pero en otros puede

persistir por semanas incluso meses. La terapia antimicrobiana para pacientes con meningitis por Micoplasmas es problemática, ya que éstos no son susceptibles a los antibióticos habitualmente empleados en recién nacidos. Lo anterior se encuentra relacionado a las características de la membrana de los micoplasmas, descritas anteriormente. Pese a la sensibilidad intermedia a los aminoglucósidos estos no son considerados medicamentos de elección ya que las concentraciones mínimas inhibitorias de estos medicamentos para los Micoplasmas genitales son generalmente muy elevadas. Eritromicina, doxiciclina, tetraciclina y cloranfenicol son fármacos empleados como tratamiento para las infecciones por *Ureaplasma urealyticum*⁴⁻²⁶

La identificación del *Ureaplasma* es difícil, se trata de un organismo fastidioso y con requerimientos especiales en los medios de cultivo. Por esta razón muchos laboratorios no cultivan micoplasmas. Pierde viabilidad especialmente si las muestras se resecan o se someten a calor. Lo ideal es su procesamiento inmediato. Si no es posible se debe emplear un medio de transporte, y si se va a retrasar el procesamiento unas horas, se debe mantener la muestra en nevera el menor tiempo posible o congelar a -70 °C si el retraso es superior a 24 horas (la congelación a -20°C produce pérdida de viabilidad). Para el transporte de muestras para cultivo, son válidos los medios 10B o SP-4. El caldo 10B, se enriquece con urea para aislar *U. urealyticum*. La adición de clindamicina o lincomicina (10 mg/L) convierte al medio en selectivo para ureaplasmas. Para el aislamiento diferencial de *M. hominis* y *U. urealyticum* se utiliza el agar A8¹⁻¹⁴.

Las muestras deben homogeneizarse antes de la siembra. En el caso de muestras líquidas se centrifugan a 600 *g* durante 15 minutos y se inocula el sedimento. Para neutralizar la posible presencia de antibióticos, anticuerpos y otros inhibidores, es muy importante que las muestras se diluyan antes de la siembra, lo que ya ocurre al utilizar el medio de transporte. Se inoculan diluciones seriadas en caldo 10B y agar A8, incubando los caldos en atmósfera aerobia y las placas en 5-10% CO₂ a 37°C. Los caldos se deben observar durante 4 días para detectar signos de alcalinidad y las placas de cultivo se incuban 7 días antes de descartarlas como negativas. La búsqueda de colonias en la superficie del agar se realiza utilizando una lupa (x20 o x60 de aumento

total). La presencia de *U. urealyticum* se pone de manifiesto habitualmente a los 1-3 días por un cambio de color debido a la ureasa y se observan colonias marrones granulares de entre 15 a 60 μm de diámetro.

El medio de Shergpad 10B y el Agar 8B son los medios más comúnmente empleados para su aislamiento.

Las técnicas de cultivo convencionales son, con mucho, las más ampliamente utilizadas como el método de aislamiento Ureaplasma. Sin embargo, hay que tener en cuenta los importantes inconvenientes que conlleva, como el largo intervalo de tiempo antes de que los resultados estén disponibles para el clínico (2-7 días), así como la necesidad de medios de cultivo especiales en los laboratorios de referencia.

Existen numerosos equipos de cultivo comerciales para la detección, cuantificación, determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de *U. urealyticum* proveniente de diferentes tipos de muestra. Estas alternativas presentan algunas ventajas con respecto al método tradicional ya que a menudo requieren períodos de incubación breves. Además, pueden resultar muy útiles en laboratorios que no se especializan en la detección de micoplasmas.

Las pruebas rápidas para detectar micoplasmas se consideran una alternativa diagnóstica útil en sitios donde el aislamiento de estas bacterias es bajo o donde el manejo de las condiciones microbiológicas necesarias para su aislamiento es poco accesible.

En la actualidad las técnicas de enzimoimmunoanálisis (EIA), son las utilizadas más frecuentemente para el diagnóstico de Micoplasmataceas, incluyendo además en los mismos kits conteo de colonias y antibiograma selectivo; por la comodidad de su uso y porque la sensibilidad y especificidad de esta técnica es superior al 95%, esencialmente en diagnóstico de cervicitis, ya que la colonización por estas bacterias es sumamente frecuente en cualquier población con actividad sexual analizada.

Existen múltiples serotipos de *U. Urealyticum*. El diagnóstico indirecto o serológico solo tiene valor en las infecciones profundas (salpingitis, prostatitis), pues la respuesta inmunitaria con frecuencia resulta aleatoria en la patología genitourinaria. Parece cada vez más evidente que ciertos serotipos sean responsables de una determinada sintomatología (serotipos 2 y 5 para *Ureaplasma*). La técnica de inmunofluorescencia, con los microorganismos purificados y fijados en lámina portaobjetos, es sencilla y parece dar resultados reproducibles para la detección de anticuerpos.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de biología molecular que permite la rápida replicación del ADN. Con la PCR, cantidades mínimas de material genético pueden ser amplificadas millones de veces en pocas horas permitiendo la detección rápida y fiable de los marcadores genéticos de enfermedades infecciosas, cáncer y desórdenes genéticos.

El uso de la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa ha aumentado mucho la capacidad de los científicos para estudiar el material genético. Desde su invención por científicos de Cetus Corporation en 1983, la PCR ha cambiado la forma en la que se lleva a cabo la investigación y diagnóstico médico. La PCR está diseñada según el principio natural de replicación del ADN. Es un proceso de tres pasos, designado como un ciclo, que se repite un número específico de veces.

Un ciclo de PCR consiste en los siguientes pasos:

1. Desnaturalización
2. Alineación
3. Extensión

Este proceso tiene lugar en un termociclador, un instrumento que automáticamente controla y alterna las temperaturas durante períodos programados de tiempo para el número apropiado de ciclos de PCR (generalmente entre 30 y 40 ciclos).

Desnaturalización por calor. El calor (generalmente $> 90^{\circ}\text{C}$) separa la doble hebra de ADN en dos filamentos, esto se conoce como "desnaturalización". Puesto que los enlaces del hidrógeno que unen las bases de uno a otro son débiles, se rompen a altas temperaturas, mientras que los enlaces entre fosfatos y desoxirribosa, que son enlaces covalentes más fuertes, permanecen intactos.

Alineación – unión de la sonda a la secuencia diana. El objetivo no es replicar la hebra entera de ADN sino replicar la secuencia diana de aproximadamente 100-600 pares de bases que es única en el organismo. Los iniciadores marcan el final de la secuencia diana: éstos son sintéticos y cortos, creados a partir de una hebra única de ADN y que normalmente constan de 20-30 bases, con una marca de biotina 5' al final para ayudar a la detección.

Temperatura de Alineación: generalmente ocurre entre 40°C y 65°C , dependiendo de la longitud y la secuencia de bases de los iniciadores. Permite que éstos se unan a la secuencia diana con alta especificidad.

Extensión. Una vez que los iniciadores se han unido a las secuencias complementarias de ADN, la temperatura se eleva aproximadamente a 72°C y la enzima Taq polimerasa replica los filamentos de ADN.

La Taq ADN polimerasa es una ADN polimerasa recombinante termoestable del organismo *Thermus aquaticus*, que a diferencia de otras polimerasas se mantiene activa a elevada temperatura. Comienza el proceso de síntesis en la región marcada por los iniciadores y sintetiza una nueva hélice de ADN de doble hebra, ambas idénticas al original, para facilitar la unión de los nucleótidos complementarios que quedan libres en la solución (dNTPs).

La extensión comienza siempre en el extremo 3' del iniciador creando una doble tira a partir de cada una de las hebras individuales. La Taq ADN polimerasa sintetiza exclusivamente en la dirección 5' a 3'. No obstante los nucleótidos libres en la solución sólo se añaden al extremo 3' del iniciador, construyendo la tira complementaria de la secuencia de ADN.

Al final del primer ciclo de PCR, nos encontramos dos nuevas tiras de ADN idénticas al original.

Mientras que el número de ciclos aumenta, una hebra con una longitud más definida sirve como plantilla para la nueva secuencia sintetizada. La hebra de ADN sintetizada a partir esta plantilla tiene una longitud definida que está limitada por el extremo 5' de cada uno de los dos iniciadores. Estas hebras de ADN se denominan AMPLICONES.

Después de algunos ciclos, las hebras de DNA que corresponden a la secuencia diana, están presentes en un número mucho mayor que las secuencias de longitud variable. En otras palabras la secuencia flanqueada o definida por los dos iniciadores es la sección que se amplifica.

1.2 Planteamiento del problema

Las infecciones congénitas y perinatales que afectan al feto y recién nacido pueden provocar enfermedades a nivel de sistema nervioso central con graves consecuencias en el desarrollo cerebral. La incidencia de meningitis bacteriana es mayor durante el período neonatal que en cualquier otro período de la vida, en éste grupo etario la tasa de ataque es del 1%, acompaña del 5 al 20% de los cuadros de sepsis y la mortalidad es cercana al 20%. Lo anterior sucede pese al gran número de pacientes que cursan con sospecha clínica de meningitis, a estos pacientes se le realiza toma de muestra de líquido cefalorraquídeo para histoquímico/citológico y cultivo, más no para búsqueda de *Ureaplasma urealyticum*.

La prevalencia de neuroinfección por *U urealyticum* se estima de un 8% de acuerdo a Viscardi RM en 2008⁸ y Casell³. En México no existe algún estudio de incidencia de infecciones por *Ureaplasma urealyticum*. El presente trabajo se plateo para responder a la siguiente pregunta.

1.3 Pregunta de investigación

¿Cuál es la frecuencia de identificación de *Ureaplasma urealyticum* en el líquido cefalorraquídeo en recién nacidos con sospecha de sepsis y/o meningitis empleando cultivo en medio líquido y reacción en cadena de la polimerasa punto final?

1.4 Justificación

En la década pasada se comenzó a considerar a los micoplasma genitales como patógenos capaces de invadir el sistema nervioso central de los neonatos. Lo anterior por algunas de las características de la infección por éste microorganismo, como son: la tasa de colonización en mujeres en edad fértil que es del 40 al 80%, la tasa de transmisión materno-fetal que va en un que va del 8.5 al 58%. La detección de infección en sistema nervioso central requiere un alto grado de sospecha dado el amplio espectro clínico de las infecciones por *Ureaplasma* que van desde manifestaciones discretas con remisión espontánea de la infección a casos graves, que cuando se diagnostican de manera oportuna evolucionan hacia la mejoría, pese a algunos casos con déficit neurológicos posteriores, posterior a tratamiento con cloranfenicol/clindamicina o tetraciclinas (pese al riesgo de daño a la matriz dentaria en los casos en los que se ha documentado resistencia a otro tipo de antibióticos). La realización de pruebas para la identificación de *Ureaplasma urealyticum* no es parte del estudio inicial, en parte por la dificultad para su aislamiento utilizando los medios de cultivo convencional, en parte por el tiempo y técnica que demandan este tipo de cultivos. Aunque ésta última barrera puede ser superada con el empleo de técnicas de biología molecular aplicadas a la microbiología como la de la reacción en cadena de la polimerasa utilizando iniciadores basados en la secuencia de nucleótidos de los genes del *Ureaplasma*, como se emplea ya en identificación en muestras de lavado broncoalveolar o muestras de secreciones en genitales de adultos. Con la ventaja de tratarse de un método sensible, específico y con la ventaja de la posibilidad de obtener resultados en menos de 24h.

1.5 Objetivo general

Determinar la frecuencia de identificación de *Ureaplasma urealyticum* en líquido cefalorraquídeo empleando el cultivo en medio líquido específico y la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa punto final

1.6

Objetivo específico

- ❖ Determinar la frecuencia de identificación de *Ureaplasma urealyticum* en líquido cefalorraquídeo en recién nacidos empleando cultivo en medio líquido específico

- ❖ Determinar la frecuencia de identificación de *Ureaplasma urealyticum* en líquido cefalorraquídeo en recién nacidos empleando y Reacción en cadena de la polimerasa punto final

- ❖ Valorar el grado de concordancia en las identificaciones de *Ureaplasma urealyticum* en cultivo en medio líquido específico y la reacción en cadena de la polimerasa punto final

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Diseño del estudio

Descriptivo, observacional, transversal, retrolectivo

2.2 Universo

Líquido cefalorraquídeo proveniente de recién nacidos hospitalizados en las unidades de terapia intensiva e intermedia a los que como parte de su tratamiento y protocolo institucional se les realizó punción lumbar.

2.3 Muestra

Muestras de líquido cefalorraquídeo provenientes pacientes hospitalizados en los servicios de Terapia Intensiva y Terapia Intermedia del INPer neonatal durante el periodo de Enero de 2008 – Septiembre de 2009

2.4 Criterios de inclusión

- ❖ Líquidos cefalorraquídeos provenientes de pacientes hospitalizados en el servicio de Terapia Intensiva e Intermedia del INPer que cumplieran los siguientes criterios
- ❖ Pacientes menores de 28 días de vida extrauterina
- ❖ Pacientes sin identificación de algún microorganismo en el líquido cefalorraquídeo

2.5 Criterios de exclusión

- ❖ Muestras de líquido cefalorraquídeo cuyo volumen fue menor a 1ml

- ❖ Muestras de líquido cefalorraquídeo que tardaran más de 1h en ser procesadas

2.6 Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra fue calculado de acuerdo a la siguiente formula, donde:

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 p(1-p)}{d^2}$$

n = tamaño de muestra
*Z*_α = 1.960
P = Proporción o prevalencia reportada en la literatura (0.08)
d = Precisión de la estimación (0.05)

$$n = \frac{1.960_{\alpha}^2 0.08(1 - 0.08)}{(0.05)^2}$$

$$n = \frac{(3.8416) 0.08(0.92)}{(0.0025)}$$

$$n = \frac{(3.8416) (0.0736)}{(0.0025)}$$

$$n = \frac{.2827417}{0.0025}$$

$$n = 113$$

2.7 Métodos de recolección y análisis estadístico

La colección de muestras inicio en Enero del 2008 con un procesamiento inicial de 32, durante el período Junio Septiembre del 2009 se colecto un segundo grupo de muestras que se encuentran en procesamiento y con resultados pendientes. Al

completar la muestra se analizará la frecuencia y concordancia de las identificaciones por índice kappa.

2.8 Descripción general del estudio y procedimientos de laboratorio

Las muestras de líquido cefalorraquídeo de recién nacidos con diagnóstico de probable sepsis y/o meningitis se dividieron en alícuotas. Las porciones fueron sembradas en caldo urea, 300 µl para reacción en cadena de la polimerasa tiempo final. Los datos de los pacientes, registros y resultados de las muestras analizadas por uno y otro método fueron consultados en los registros de los laboratorios de Biología molecular, Microbiología y Archivo del Instituto Nacional de Perinatología (INPer)

a. Cultivo medio líquido para el diagnóstico de *U. urealyticum*

El caldo urea: 2 gramos de base para micoplasmas, 65 mL de agua destilada, 10 mL de dializado de levadura, 0.1 gramo de penicilina, 5 mL de urea al 10%, 1.3g de agar bacteriológico, 25 mL de suero de caballo. Las muestras fueron resuspendidas en 2ml de caldo urea, incubándose a 36°C durante 10 días una vez identificadas las positivas se procede a confirmar el aislamiento sembrándose en agar chocolate. Se considero positiva para *U. urealyticum* cuando existió ausencia de crecimiento en medio solido posterior a 72h. Los medios fueron incubados a 37°C durante 14 días, con una revisión diaria del viraje que se orientó por el cambio de color del indicador en el caldo. Cuando hubo cambio del medio a color rojo o transparente, la muestra se resembró en un nuevo caldo e inoculó en una placa de agar chocolate, que se revisó a las 24 horas. Cuando en la primer siembra se detectó turbidez la muestra se hizo pasar en filtros de celulosa para posteriormente sembrar nuevamente en caldo y agar chocolate. Se interpretó como positivo a *Ureaplasma urealyticum* cuando se presentó de nuevo el viraje en el caldo respectivo y el cultivo en placa resultó negativo.

b. Extracción de ADN de líquido cefalorraquídeo

En paralelo, 300 μ l de líquido cefalorraquídeo fueron colocados en tubos tipo Eppendorf se le adicionaron 300 μ l de solución de lisis (proteinasas K 200 mg/ml), se agitaron en vortex durante 30 segundos y se incubaron a 56°C durante 1h (con agitación periódica en vortex).

Se agregó posteriormente 300 microlitros de fenol, fueron agitados en vortex y fueron centrifugados a 3 000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, al concluir se extrajo la fase acuosa y se depositaron en nuevos tubos Eppendorf, se agregaron 300 microlitros de una mezcla fenol cloroformo (1:1) se agitaron en vortex y en seguida se centrifugaron a 3 000rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. La fase acuosa se transfirió a nuevos tubos y se le agregaron 600 microlitros de cloroformo; los tubos se agitaron en vortex durante 5 minutos y se centrifugaron nuevamente a 3 000 rpm por 10 minutos; el sobrenadante se transfirió a nuevos tubos y se añadieron 30 microlitros de una solución de NaCl 1 M y 1 mL de etanol absoluto al 4°C, los tubos se agitaron por inversión y se centrifugaron a 12 000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el botón resultante (DNA) se resuspendió en una solución Tris-EDTA. En seguida se verificó la existencia de DN, corriendo las muestras en un gel de agarosa al 0.8 % a 75 V durante 1h; al término de corrimiento, el gel se reveló con una solución de bromuro de etidio a 0.1% para ser evaluado en un analizador de imágenes.

c. Amplificación del ADN por reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de *U. urealyticum*

Una vez verificada la integridad del DNA se realizó la PCR, con una muestra con volumen final de 35 μ l; la mezcla contenía agua des-ionizada, solución buffer (1x), 10 mM de dNTPs, 0.6 pMol/ de cada iniciador, 2.5 mM de MgCl₂, 1.5 U/ μ l de Taq

DNA polimerasa. La reacción se inició con una secuencia de desnaturalización del DNA a 94°C durante tres minutos única, y 35 ciclos de amplificación (alineación de los iniciadores a 60°C durante cinco minutos y un paso de extensión a 72°C por minuto y desnaturalización a 94°C por 25 segundos). En primera instancia, amplificamos un segmento genómico común a la clase Mollicutes con la utilización de cebadores genéricos. En la tabla 1 se describen los oligonucleótidos empleados. Las muestras que resultaron positivas para esta primera amplificación, fueron sometidas a una segunda PCR con cebadores específicos para *U. urealyticum* a fin de identificar fehacientemente el agente infectante. Los productos de la amplificación y el control positivo se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, revelados con bromuro de etidio a 0.1% para ser evaluados en analizador de imágenes (Multimag, Ligth Cabinet, Alpha Innotech).

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la identificación del género *Ureaplasma*

Organismo	Juego de Oligonucleotidos	Secuencia (5'→3')	Sitio Tamaño del Amplificado	
<i>Ureaplasma spp.</i>	Sen: Antisen:	U5 U4	CAA TCT GCT CGT GAA GTATTAC ACG ACG TCC ATA AGC AAC T	Ureasa 429 pb

3.

RESULTADOS

De manera inicial se procesaron 37 muestras, los resultados fueron como a continuación.

❖ **Cultivo en medio líquido para el diagnóstico de infección por *U. urealyticum***

Tres muestras de líquido cefalorraquídeo fueron positivas al ser cultivadas en medio de cultivo caldo específico, que corresponden al 8%

❖ **Reacción en cadena de la polimerasa punto final para el diagnóstico de infección por *U. urealyticum***

Tres muestras de líquido cefalorraquídeo fueron positivas al ser analizadas por PC punto final que corresponden al 8%

Únicamente en una muestra existió identificación positiva por ambos métodos, el 2%. La concordancia entre las pruebas diagnósticas fue baja ($\kappa = 0.262$)

Tabla 1. Distribución de las muestras de líquido cefalorraquídeo de acuerdo a los resultados obtenidos

		Cultivo en Caldo Urea		
		+	-	
PCR punto final	+	1	2	3
	-	2	27	29
		3	29	32

Las cinco muestras positivas correspondían a pacientes con probable sepsis, no existieron alteraciones en las características del líquido cefalorraquídeo, 4 eran pacientes recién nacidos prematuros.



Ilustración 1. Productos de amplificación por PCR de los líquidos cefalorraquídeos

4.

DISCUSIÓN

En algunas series se han reportado aislamientos de *Ureaplasma urealyticum* con una frecuencia del 8% (Cassel et al, 1993) al 1.5% (Valencia, 1993). La frecuencia en nuestra serie es del 8% en cada método considerándose por separado, encontrándose entre el rango referido en otras latitudes.

En cuanto a las características clínicas de los pacientes de las que provenían las muestras se refería en los expedientes clínicos que cursaban con sospecha de sepsis, no existió alguno asociado a sospecha de meningitis, similar a lo reportado por Valencia y cols. Lo anterior ha sido atribuido por algunos autores como prueba de que la invasión al sistema nervioso central se da a través de otra vía, ocasionada tal vez por la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica en el periodo neonatal (Valencia, 1993; Cassel 2001; Waites, 1988, 1990, 2005). El grupo estaba compuesto en un 80% por muestras provenientes de RN prematuros, de acuerdo a reportado por otros autores.

Acerca de la concordancia de las identificaciones, fue baja, contrario a lo esperado existieron muestras positivas para cultivo con caldo específico que resultaron negativas en PCR (Blanchard, 1993). Aunque la mayoría de los estudios en los que se comparan uno y otros métodos se realizan en muestras diferentes a líquido cefalorraquídeo, ya que la PCR en líquido cefalorraquídeo es complicada, dada la existencia de factores inhibidores no bien definidos.

5.

CONCLUSIONES

La infección por *Ureaplasma urealyticum* en sistema nervioso central es frecuente, y sus manifestaciones clínicas no se asocian a alteraciones neurológicas durante el período neonatal, pero sí en etapas posteriores. En cuanto a la diferencia en los aislamientos entre las pruebas se atribuyen al tamaño muestral procesado, por lo que continuaremos trabajando en la colección y procesamiento de muestras y resultados hasta completar un total de 113.

Descartar la infección en sistema nervioso central por *Ureaplasma urealyticum* puede ser una herramienta eficaz durante el abordaje de aquellos pacientes con sepsis en los que los medios de cultivo tradicionales no han podido identificar un agente causal. Pudiendo ser éste un tema de estudio para investigaciones posteriores encaminadas a evaluar la evolución clínica posterior a terapia específica y el desarrollo neurológico pasada la edad neonatal.

6.

REFERENCIAS

- 1) Klein JO. Bacterial sepsis and meningitis. En: Remington JS, Klein JO, editors. Enfermedades infecciosas en el feto y recién nacido. 5a Edición. Philadelphia: WB Saunders; 2001.p. 943-98.
- 2) Pinna G, Skevaki C, Kafetzis D. The significance of *Ureaplasma urealyticum* as pathogenic agent in the paediatric population. Curr Opin Infect Dis 2006; 19:283-289.
- 3) Cassell G, Waites K, Watson H, Crouse D, Harasawa. *Ureaplasma urealyticum* Intrauterine infection: Role in Prematurity and Disease in Newborns. Clin Microbiol Rev 1993;6 : 69-87.
- 4) Wang EE, Matlow Ag, Ohlsson A, et al. *Ureaplasma urealyticum* infections in the perinatal period. Clin Perinatol 1997;24:91-105.
- 5) Regan JA, Greenberg EM. Perinatal *Ureaplasma urealyticum* infection and colonization: the association with preterm delivery and spectrum of disease in neonates. Reviews in Medical Microbiology 2001; 12: 97-107.
- 6) Alcaraz-Castro S, Greenberg E, Regan J. Longitudinal study for detection of *Ureaplasma urealyticum* (Uu) colonization of the respiratory tract in very-low-birth-weight infants PCR Vs Culture: Which test is better? Pediatr Res 2000; 47: A 339
- 7) Waites KB, Crouse DT, Cassell GH. Systemic neonatal infection due to *Ureaplasma urealyticum*. Clin Infect Dis 1993; 17: S131-S5.

- 8) Viscardi R, Hashmi N, Gross G, Sun C, Rodriguez A, Fairchild K. Incidence of invasive *Ureaplasma* in VLBW infants: relationship to severe intraventricular hemorrhage. *Journal of Perinatology* 2008;28:759-765
- 9) Hermansen MC, Hermansen MG. Perinatal Infections and Cerebral Palsy. *Clin Perinatol* 2006; 33: 315-333.
- 10) Reyna J, Flores S, Morales M, Ortiz F. "Identificación de *Ureaplasma urealyticum* en líquido cefalorraquídeo (LCR) de recién nacidos con sospecha de neuroinfección mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Fase de estandarización". *Rev Enfer Infec Pediat* 2007; 21:42-45
- 11) Mayo D, Barrios V, Ruiz A, Cedillo L, Rivera T. Aislamiento de mollicutes en faringe y tracto urogenital. *Enf Inf Microbiol* 2009; 29:6-10
- 12) Quinn PA. "*Mycoplasma* infection of the fetus and newborns". *Prog Clin Biol Res* 1988; 281:107-151.
- 13) Kundsinn R, Driscoll S, Pelletier P. "*Ureaplasma urealyticum* incriminated in perinatal morbidity and mortality". *Science* 1981; 213: 474-475
- 14) Rottem S. "Interaction of *mycoplasmas* with host cells". *Physiol Rev* 2003; 83:417-432.
- 15) Cassell G, Waites K, Crouse D, *Mycoplasmal* infections. En: Remington J, Klein J, editors. *Infectious Diseases of the Fetus & Newborn Infant*, 5th edition, WB Saunders company; 2001. p. 943-98.
- 16) Sánchez P, Perinatal infections and brain injury: current treatment options. *Clin Perinatol* 2002; 29: 799-826.

- 17) Waites K, Brenda K, Schelonka. *Micoplasmas and Ureaplasmas as Neonatal pathogens*. CMR 2005; 18: 757-789
- 18) Waites K, Rudd P, Crouse D, et al. Chronic *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infections of central nervous system in preterm infants. Lancet 1988; 1:17–21.
- 19) Stahelin-Massik J, Levy F, Friderich P, Schaad U. Meningitis caused by *Ureaplasma urealyticum* in a full term neonate. Pediatr Infect Dis J 1994; 13:419-421.
- 20) Neal TJ, Roe MF, Shaw NJ, Spontaneously resolving *Ureaplasma urealyticum meningitis*. Eur J Pediatr 1994; 153:342-343.
- 21) Hentschel J, Abele-Horn M, Peters J. *Ureaplasma urealyticum* in the cerebrospinal fluid of a premature infant. Acta Paediatr 1993; 82:690-693.
- 22) Normann E, Lacaze-Masmontiel T, Eaton F, Schwendimann L, Gressens P, Thebaud B. A Novel Mouse Model of *Ureaplasma*-Induced Perinatal Inflammation: Effects on Lung and Brain Injury. Pediatric Research April 200;. 65:430-436.
- 23) Berger A, Witt A, Haiden N, Kaider A, Klebermasz K, Fuiko R, Langgartner M, Pollak A. Intrauterine infection with *Ureaplasma* species is associated with adverse neuromotor outcome at 1 and 2 years adjusted age in preterm infants. Journal of Perinatal Medicine 2009; 37: 72-78.
- 24) Regan J; Greenberg E. Perinatal *Ureaplasma urealyticum* infection and colonization: the association with preterm delivery and the spectrum of disease in neonates. Reviews in Medical Microbiology 2001; 12:97-107.

- 25) Bonnin F, Pettitjean B, Guillois D, Laloum M, Fretignet, freymuth F. Prospective study of neonatal genital *mycoplasma* colonization and infection. Arch Pediatr 1995; 2:636-42
- 26) Brus F, van Warrde W, Shoots C, Oetomo B. Fatal *ureaplasma* pneumonia and sepsis in newborn infant. Eur J Pediatr 1991; 150:782-783.
- 27) Heggie AD, Jacobs MR, Butler V, et al. Frequency and significance of isolation of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* from cerebrospinal fluid and tracheal specimens from low birth weight infants. J Pediatr 1994; 124:956–961.
- 28) Hentschel J, Abele-Horn M, Peters J. *Ureaplasma urealyticum* in the cerebrospinal fluid of a premature infant. Acta Paediatr 1993; 82:690–693.
- 29) Garland SM, Murton LJ. Neonatal meningitis caused by *Ureaplasma urealyticum*. Pediatr Infect Dis J 1987; 6:868–870.
- 30) Rivera T, Centeno T, Santellan O, Rodríguez P. Prevalencia de *Ureaplasma urealyticum* en mujeres. Rev Mex Patol Clin 2004; 51: 33-36.
- 31) Stahelin-Massik J, Levy F, Friderich P, Schaad UB. Meningitis caused by *Ureaplasma urealyticum* in a full term neonate. Pediatr Infect Dis J 1994; 13:419–421.
- 32) Waites K, Crouse D, Cassell G. Therapeutic considerations for *Ureaplasma Urealyticum* infection Dis 1993; 17: 208-214.
- 33) Sánchez P. Perinatal Infections and brain Injury: current treatment options Clin Perinatol 2002; 29: 799-826.

- 34) Goldstein B, Giroir B, Randolph A. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions of sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med* 2005; 6:2-8.
- 35) Kermovant-Duchemint E, Laborie S, Rabillooud M, Lapillone A, Claris O. Outcome and prognosis factors in neonates with septic shock. *Pediatr Crit Care Med* 2008; 9:186-191.

7.

ANEXOS

7.1 SOLUCIONES Y REACTIVOS

7.1.1 Solución de lisis

Tris base (pH 8.0)	10.0 mM
EDTA (pH 8.0)	10.0 mM
NaCl 1M	50.0 mM
SDS	0.2 %
Proteinasa K	200.0 µg/mL

*Esterilizar la solución a través de una membrana *milipore* de 0.2 µm.

7.1.2 Cloruro de sodio 1M

NaCl	2.92 g
Agua bidestilada	50.0 ml

7.1.2 Regulador Tris-EDTA (TE, pH 8.0)

Tris HCl (pH 8.0)	10.0 mMol
EDTA (pH 8.0)	1.0 mMol

7.1.3 Regulador de corrimiento por electroforesis

Tris base	54.0 g
Ácido bórico	27.5 g
EDTA 0.5 M (pH 8.0)	20.0 ml

7.1.4 Regulador de carga para electroforesis

Azul de bromofenol	0.25%
Sacarosa	40.0%

7.1.5 Bromuro de Etidio

Bromuro de etidio

1.0g

Sacarosa

100ml

7.1.6 Caldo urea

Caldo urea (2 gramos de base para micoplasmas, 0.75 mL de rojo de fenol, 65 mL de agua destilada, 10 mL de dializado de levadura, 0.1 gramo de penicilina, 5 mL de urea al 10%, 25 mL de suero de caballo).

7.2 Productos biológicos

7.2.1 Proteinasa K

Protein serin

Solubilizar en solución
de Tris 50 mM Acetato
de Calcio 2mM pH 8.0)

Calbiochem (San Diego,
California, USA)

Tritirachium álbum
2KU