



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

T E S I S:

“Diagnóstico de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* en neonatos de unidad de cuidados intensivos del INPer IER, mediante una prueba de detección rápida en secreción bronquial, comparada con medios de cultivo y reacción en cadena de polimerasa “

QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

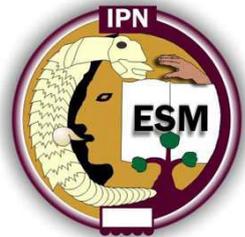
Presenta:

DR. RAFAEL GALVÁN CONTRERAS

Directores de Tesis:

M. en C. ENRIQUE SEGURA CERVANTES

D. en C. ELVIA MERA JIMÉNEZ



México, D.F., Abril de 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 10:00 horas del día 30 del mes de Mayo del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ESM para examinar la tesis titulada:

“Diagnostico de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* en neonatos de unidad de cuidados intensivos neonatales del INPer IER mediante una prueba de detección rápida en secreción bronquial, comparada con medios de cultivo y reacción en cadena de polimerasa.”

Presentada por el alumno:

Galván

Apellido paterno

Contreras

Apellido materno

Rafael

Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	8	9	2
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias de la Salud

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Elvia Mera Jiménez

M. en C. Enrique Segura Cervantes

CALZADA MENDOZA
CLAUDIA CAMELIA

Dra. Claudia Camelia Calzada
Mendoza

Dra. María Esther Ocharan Hernández

Dr. José Alfredo Sierra Ramírez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Eleazar Lara Padilla



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
I.P.N.
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN
CONTROL ESCOLAR

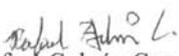


INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA SESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 30 del mes Mayo del año 2011, el que suscribe Rafael Galván Contreras alumno del Programa de Maestría en Ciencias de la Salud con número de registro B091892 adscrito a La Escuela Superior De Medicina, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Elvia Mera Jiménez y M. en C. Enrique Segura Cervantes y cede los derechos del trabajo intitulado "Diagnostico de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* en neonatos de unidad de cuidados intensivos neonatales del INPer IER mediante una prueba de detección rápida en secreción bronquial, comparada con medios de cultivo y reacción en cadena de polimerasa", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección rafagcsx@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Rafael Galván Contreras

Nombre y firma

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Infectología e inmunología perinatal del Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes" bajo la dirección del M. en C. Enrique Segura Cervantes y de la D. en C. Elvia Mera Jiménez.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de Tesis es un esfuerzo en el que directa o indirectamente, participaron varias personas

Agradezco a Dios por darme la fortaleza espiritual para avanzar en mi formación profesional.

A mis padres y hermano que siempre me han apoyado y son ejemplo de vida.

Al Dr. Enrique Segura Cervantes y Dra. Elvia Mera Jiménez por haber confiado en mí y por su paciencia durante la dirección de este trabajo de tesis.

A la Dra. Esther Ocharán, Dra. Claudia Calzada y Dr. Alfredo Sierra por sus enseñanzas, consejos y esfuerzo realizado en la dirección de este trabajo de tesis.

A las químicas Graciela Villeda y Selene García por su apoyo incondicional, y sin el cual no hubiese podido consolidar este trabajo.

Al Instituto Politécnico Nacional e Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” por darme los elementos para desarrollarme profesionalmente.

ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosín trifosfato (del inglés <i>Adenosine TriPhosphate</i>)
Cu	Caldo urea
Ca	Caldo arginina
CDC	Centros de control y prevención de Enfermedades
CO ₂	Dióxido de carbono
CV	Cultivo cervicovaginal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Especificidad
EUA	Estados Unidos de América
g	Gramos
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
IC95%	Intervalo e confianza del 95%
IL	Interleucina
INPer IER	Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”
K+	Potasio
mg	miligramos
<i>Mh</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
ml	mililitro
mEq	miliequivalentes
µm	micrómetros
NH ₃ ⁺	Amoniaco
NK	Células asesinas naturales (del inglés “ <i>Natural Killer</i> ”)
n	Número
Na+	Sodio
nm	Nanómetros
O ₂ ⁻	Anión Superóxido
P	Proporción esperada
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PPLO	<i>Pleuropneumoniae liorganism</i>
RPM	Ruptura prematura de membranas
S.M.h.	Activador de crecimiento para <i>Mycoplasma hominis</i>
UCIN	Unidad de cuidados intensivos neonatales

UFC	Unidades formadoras de colonias
U.M.M.t	Vial de medio de transporte para micoplasma
U.M.M.lyo	Vial de medio de crecimiento liofilizado
<i>Uu</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo
W	Amplitud del intervalo de confianza
Z α	Desviación normal estándar

GLOSARIO

-Ácido desoxirribonucleico: Es un tipo de ácido nucleico, una macromolécula que forma parte de todas las células. Contiene la información genética usada en el desarrollo y el funcionamiento de los organismos vivos conocidos y de algunos virus, y es responsable de su transmisión hereditaria **(Dahm, 2005)**.

-American Type Culture Collection (de las siglas en inglés ATCC): Es una organización privada, cuya misión se centra en la adquisición, la autenticación, producción, conservación, desarrollo y distribución de los microorganismos de referencia estándar, líneas celulares y otros materiales para la investigación en las ciencias de la vida. Fundada en 1914, la ATCC se ha convertido en el líder mundial en la investigación y el desarrollo de conocimientos especializados para la identificación, caracterización, conservación y distribución de una amplia gama de líneas de células y los microbios **(Flannigan, 2001)**.

-Arginina: Aminoácido que se encuentran formando parte de las proteínas. En el tejido hepático, la arginina puede ser sintetizada en el ciclo de la ornitina (o ciclo de la urea). Se clasifica, en población pediátrica, como un aminoácido esencial **(Barbul, 1986)**.

-Citocinas: Son proteínas que regulan la función de las células que las producen u otros tipos celulares. Son los agentes responsables de la comunicación intercelular, inducen la activación de receptores específicos de membrana, funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis, crecimiento y modulación de la secreción de inmunoglobulinas. Son producidas fundamentalmente por los linfocitos y los macrófagos activados, aunque

también pueden ser producidas por leucocitos polimorfonucleares (PMN), células endoteliales, epiteliales y del tejido conjuntivo. De acuerdo a las células que las produzca se denominan linfocinas (linfocito), monocinas (monocitos, precursores de los macrófagos) o interleucinas (células hematopoyéticas). Su acción fundamental es en la regulación del mecanismo de la inflamación. Hay citocinas proinflamatorias y otras antiinflamatorias.

-Concordancia: Los estudios de concordancia abarcan una amplia gama de diseños relacionados entre sí que se utilizan principalmente para evaluar el grado de acuerdo entre los clínicos al interpretar pruebas diagnósticas, o la exactitud con que estas pruebas orientan hacia un diagnóstico correcto (Dawson-Saunders, 1994).

-Especificidad: En una prueba diagnóstica se refiere a la probabilidad de que un sujeto sano tenga un resultado negativo en la prueba (Dawson-Saunders, 1994).

-Hidrólisis: Reacción ácido-base entre una sustancia, típicamente una sal, y el agua. Esta reacción es importante por el gran número de contextos en los que el agua actúa como disolvente. También se aplica a algunas reacciones ácido-base en las que participa el agua y se rompe un enlace covalente (Morcillo, 1989).

-Intervalo de confianza: Un intervalo de confianza es un rango de valores (calculado en una muestra) en el cual se encuentra el verdadero valor del parámetro, con una probabilidad determinada (Rada, 2007).

-Mycofast Evolution 3: Prueba rápida que permite la detección, la enumeración y la identificación del *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis* a partir de diversas muestras biológicas, basada en el metabolismo de ambas bacterias y capacidad de hidrólisis de urea (*Ureaplasma urealyticum*) y

arginina (*Mycoplasma hominis*), además de permitir identificar la susceptibilidad de estas bacterias a distintos antibióticos (**Elitech Group. France, 2003**).

-*Mycoplasma hominis*: Género de bacterias que carecen de pared celular. Pertenece a la clase *Mollicutes*, que incluye bacterias que tienen genomas pequeños, carecen de una pared celular y tienen un bajo contenido de GC (18-40%). Existen más de 100 especies reconocidas del género *Mycoplasma*. Debido a la ausencia de pared no se ven afectados por algunos antibióticos como la penicilina u otros antibióticos betalactámicos que bloquean la síntesis de peptidoglicanos (**Ryan, 2004**).

-Radicales libres de oxígeno: También conocidas como especies reactivas del oxígeno (ERO o ROS por *reactive oxygen species*) incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos orgánicos e inorgánicos. Son generalmente moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada. Estas especies se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y tienen un importante papel en la señalización celular. Sin embargo, en épocas de estrés ambiental sus niveles pueden aumentar en gran manera, lo cual puede resultar en daños significativos a las estructuras celulares. Esto lleva en una situación conocida como estrés oxidativo (**Sen, 2003**)

-Reacción en cadena de polimerasa: Conocida como **PCR** por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde. Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de DNA (**Bartlett, 2003**).

-Sensibilidad: En una prueba diagnóstica, es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo, es decir, la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga en una prueba diagnóstica un resultado positivo (Dawson-Saunders, 1994).

-Urea: Compuesto químico cristalino e incoloro, de fórmula $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$. Se encuentra abundantemente en los riñones y en la materia fecal. Es el principal producto terminal del metabolismo de proteínas en el hombre y en los demás mamíferos. La orina humana contiene unos 20g por litro, y un adulto elimina de 25 a 39g diariamente.

-*Ureaplasma urealyticum*: Bacteria perteneciente a la familia *Mycoplasmataceae*. *U. urealyticum* es parte normal de la flora genital tanto de hombres como de mujeres, se encuentra en aproximadamente 70% de los humanos activos sexualmente. También puede causar enfermedades, incluyendo uretritis inespecífica, infertilidad, corioamnionitis, aborto, nacimiento prematuro y en el período perinatal, neumonía o meningitis (Ryan, 2004).

-Valor predictivo negativo: Se define como la probabilidad de no tener la enfermedad cuando el resultado de la prueba es negativo (normal) (Dawson-Saunders, 1994).

-Valor predictivo positivo: Se define como la probabilidad de la enfermedad en un paciente con un resultado positivo (anormal) (Dawson-Saunders, 1994).

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PAGINA
Figura 1	Transmisión vertical de infecciones	25
Figura 2	Factores de riesgo para transmisión intraamniótica	26
Figura 3	Morfología colonial de <i>Mycoplasma hominis</i> y <i>Ureaplasma urealyticum</i>	31
Figura 4	Representación esquemática de Reacción en cadena de polimerasa	33
Figura 5	Fundamento de la prueba Mycofast Evolution 3	35
Figura 6	Metabolismo de <i>Mycoplasma hominis</i> y <i>Ureaplasma urealyticum</i>	36
Figura 7	Imagen: Recién nacido hospitalizado en UCIN del INPer IER, bajo ventilación mecánica	43
Figura 8	Lectura de resultados de Mycofast Evolution 3	47
Figura 9	Procedimiento por fases de PCR	53
Figura 10	Tabla de contingencia de 2x2 para determinación de validez y seguridad de una prueba diagnóstica	56

INDICE DE TABLAS

TABLA	TÍTULO	PAGINA
Tabla 1	Características de familia <i>Mycoplasmataceae</i> .	23

Tabla 2	Especies de Micoplasmas, sitios de aislamiento y metabolismo	30
Tabla 3	Categorización de variables	45
Tabla 4	Inoculación de la microplaca de Mycofast Evolution 3	46
Tabla 5	Susceptibilidad a antimicrobianos de <i>Mycoplasma hominis</i> y <i>Ureaplasma urealyticum</i>	48
Tabla 6	Interpretación del panel de Mycofast Evolution 3 y crecimiento bacteriano	48
Tabla 7	Técnica PCR: Cebadores utilizados para detección de <i>Mycoplasma hominis</i> y <i>Ureaplasma urealyticum</i>	51
Tabla 8	Esquemas antimicrobianos utilizados en los pacientes muestreados	63
Tabla 9	Cuadro tetraecoico para determinación de resultados de validez y seguridad de Mycofast Evolution 3 en detección de Mh	65
Tabla 10	Resultados de Sensibilidad, Especificidad, VPP, VPN, CPP, CPN de Mycofast E3 para detección de Mh	66
Tabla 11	Cuadro tetraecoico para determinación de resultados de validez y seguridad de Mycofast Evolution 3 en detección de Uu	68
Tabla 12	Resultados de Sensibilidad, Especificidad, VPP, VPN, CPP, CPN de Mycofast E3 para detección de Uu	69
Tabla 13	Cuadro tetraecoico para determinación de resultados de validez y seguridad de caldo urea en detección de Uu	69
Tabla 14	Resultados de Sensibilidad, Especificidad, VPP, VPN, CPP, CPN de caldo urea para detección de Uu	70
Tabla 15	Cuadro tetraecoico para determinación de resultados de validez y seguridad de caldo arginina en detección de Mh	70
Tabla 16	Resultados de Sensibilidad, Especificidad, VPP, VPN, CPP, CPN de caldo arginina para detección de Mh	71
Tabla 17	Cuadro tetraecoico para determinación de resultados de validez y seguridad de PCR en detección de Mh	71
Tabla 18	Resultados de Sensibilidad, Especificidad, VPP, VPN, CPP, CPN de PCR para detección de Mh	72
Tabla 19	Cuadro tetraecoico para determinación de resultados de validez y seguridad de PCR en detección de Uu	72
Tabla 20	Resultados de Sensibilidad, Especificidad, VPP, VPN, CPP, CPN de PCR para detección de Uu	73
Tabla 21	Comparativo de resultados de PCR, Mycofast Evolution 3 y caldos de cultivo	73
Tabla 22	Concordancia entre PCR y Mycofast Evolution 3 en muestras con control positivo para <i>Mycoplasma hominis</i>	75
Tabla 23	Concordancia entre PCR y Mycofast Evolution 3 en muestras con control negativo para <i>Mycoplasma hominis</i>	75
Tabla 24	Concordancia entre PCR y caldo arginina en muestras con control positivo para <i>Mycoplasma hominis</i>	76
Tabla 25	Concordancia entre PCR y caldo arginina en muestras con control negativo para <i>Mycoplasma hominis</i>	76
Tabla 26	Concordancia entre PCR y Mycofast Evolution 3 en muestras con control positivo para <i>Ureaplasma urealyticum</i>	77
Tabla 27	Concordancia entre PCR y Mycofast Evolution 3 en muestras con control negativo para <i>Ureaplasma urealyticum</i>	77
Tabla 28	Concordancia entre PCR y Caldo urea en muestras con control positivo para <i>Ureaplasma urealyticum</i>	78
Tabla 29	Concordancia entre PCR y Caldo urea en muestras con control negativo para <i>Ureaplasma urealyticum</i>	78

INDICE DE GRAFICOS

GRÁFICO	TÍTULO	PAGINA
Gráfico I	Pacientes muestreados por género	61
Gráfico II	Pacientes muestreados por grupo de edad gestacional	62
Gráfico III	Diagnóstico de los pacientes muestreados	63
Gráfico IV	Comparación de los resultados de validez y seguridad de PCR, Mycofast Evolution 3 y caldos de cultivo	74

RESUMEN

Ureaplasma urealyticum y *Mycoplasma hominis* son microorganismos implicados en enfermedades neonatales y maternas. Estos agentes, se han encontrado en diferentes órganos neonatos. Ambos son causa importante de neumonía en los neonatos expuestos a factores de riesgo en unidades de cuidados intensivos neonatales. Estas bacterias en laboratorio frecuentemente requieren medios de cultivo suplementados para lograr el crecimiento, lo que ha dificultado la confirmación diagnóstica. El cultivo de aspirado bronquial en medios sólidos y líquidos ha sido una herramienta valiosa de diagnóstico, sin embargo, el tiempo en que otorga resultados es prolongado, lo que se traduce en el inicio tardío de manejo antimicrobiano e incremento en la morbimortalidad de los pacientes. Actualmente existen métodos alternativos de diagnóstico de estas bacterias basados en el metabolismo microbiano, pruebas de biología molecular, ensayos inmunoenzimáticos y pruebas serológicas. Este estudio se efectuó en el Instituto Nacional de Perinatología, en el departamento de Infectología e inmunología perinatal, se utilizó una prueba de detección rápida (*Mycfast Evolution 3*), como alternativa diagnóstica para detectar *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* en muestras de aspirado bronquial de neonatos orintubados de UCIN, las cuales fueron inoculadas con cepas de referencia de ambas bacterias con la finalidad de valorar si esta prueba es capaz de detectar ambos microorganismos en secreción bronquial, ya que no hay antecedentes en la literatura, de que se haya utilizado en este tipo de secreción. Las muestras inoculadas también fueron sometidas a estudios de biología molecular (PCR) y sembradas en medios de cultivo tradicionales (caldo urea o caldo arginina) para detectar concordancia de resultados positivos y negativos obtenidos con la prueba rápida. Este estudio tuvo como finalidad comparar los resultados obtenidos con el estándar de oro. Constituye

un estudio de prueba diagnóstica, en el cual se analizaron muestras de aspirado bronquial inoculadas con cepas de referencia, por 3 diferentes métodos diagnósticos: *Mycfast evolution 3*, reacción en cadena de polimerasa y medios de cultivo. Se determinaron sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y concordancia entre los 3 métodos.

ABSTRACT

Ureaplasma urealyticum and *Mycoplasma hominis* its microorganisms implied in neonatal and maternal diseases. These agents have been in different newborn organs. Both are important cause of pneumonia in the newborn ones exposed to factors of risk in units of neonatal intensive cares. These bacteria in laboratory frequently require means of culture supplemented to obtain the growth, which has made difficult the diagnostic confirmation. The culture of bronchial secretions in solid media and liquids has been a valuable tool of diagnosis. Nevertheless, the time in which grants results is prolonged, which is translated in the delayed beginning of antimicrobial handling and increase in the morbimortalidad. At the moment alternative methods of diagnosis of these bacteria based on the microbial metabolism exist, inmunoenzimáticos tests of molecular Biology, tests and serologic tests. This study took place in the National Institute of Perinatology, in the department of Infectology and Perinatal Immunology, was used a test of fast detection (Mycofast Evolution 3), as alternative diagnostic to detect *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in samples of aspired bronchial of newborn intubated of UCIN, which were inoculated with stocks of reference of both bacteria in order to value if this test is able to detect both bronchial secretion microorganisms, since there are no antecedents in Literature, of which has been used in this type of secretion. The samples also inoculated were put under studies of Biology molecular (PCR) and seeded in traditional means of culture (urea broth or broth arginine) to detect agreement of obtained positive and negative results with the fast test.

This study had as an aim to compare the results obtained with the gold standard. It constitutes a study of diagnostic test, in which inoculated samples of aspired bronchial were analyzed with reference stocks, by 3 different methods diagnoses: Mycofast evolution 3, chain reaction of polymerase and means of culture. Sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and agreement between the 3 methods were determined.

INDICE

INDICE	
-Agradecimientos.....	5
-Abreviaturas.....	6

-Glosario.....	8
-Índice de figuras.....	13
-Índice de tablas.....	14
-Índice de gráficos.....	15
-Resumen.....	16
-Abstract.....	18
-Índice.....	20

DESARROLLO DEL PROTOCOLO

1. Marco Teórico	22
1.1 Antecedentes históricos.....	22
1.2 Características de las bacterias.....	22
1.3 Epidemiología.....	23
1.4 Importancia clínica.....	25
1.5 Mecanismos de patogenicidad.....	27
1.6 Métodos de diagnóstico.....	29
1.6.1 Métodos convencionales de diagnóstico.....	29
1.6.1.1 Medios de cultivo.....	30
1.6.1.2 Diagnóstico molecular.....	32
1.6.2 Métodos alternativos de diagnóstico.....	34
1.6.2.1 <i>Mycofast Evolution 3</i>	34
1.6.2.1.1 Fundamento de la prueba.....	34
1.6.2.1.2 Tipos de muestra utilizadas.....	36
1.6.2.1.3 Antecedentes de uso, estudios clínicos...37	
1.7 Composición química de líquidos biológicos.....	37
1.7.1 Composición química de la orina.....	37
1.7.2 Composición química del semen.....	38
1.7.3 Composición química de la secreción vaginal.....	38
1.7.4 Composición química del jugo gástrico.....	38
1.7.5 Composición química de la secreción bronquial.....	39
2- Justificación.....	40
3.- Planteamiento del Problema.....	41
4.- Pregunta de investigación.....	41
5.- Hipótesis.....	42
6. Objetivos.....	42
6.1. Objetivo general.....	42
6.2. Objetivos específicos.....	42
7.- Diseño metodológico.....	42
8.- Universo.....	43
9.- Criterios de selección de la muestra.....	44
10.- Variables.....	44
11.- Descripción general del estudio.....	45
12.- Análisis Estadístico.....	53
13.- Calculo del tamaño de muestra.....	57
14.- Recursos.....	59
15.- Comité de Bioética.....	60
16.- Resultados.....	61
17.- Discusión.....	79

18.- Conclusiones.....	87
20.- Referencias.....	89
21.- Anexos.....	95

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes históricos:

Los micoplasmas fueron descritos por primera vez en 1898 por Nocard y Roux, que aislaron a *Mycoplasma mycoides* a partir de casos de pleuroneumonía bovina. En ese mismo siglo se aisló de carneros y cabras la segunda especie de micoplasmas y se les denominó *Pleuropneumoniae liorganism* (PPLO). El primer micoplasma detectado en humanos fue *Mycoplasma hominis*, recuperado en 1938 de un absceso de las glándulas de Bartholin. Los micoplasmas, descubiertos por Shepard en 1954, son catalogados como 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 a la urea (Ramírez, 2004)

1.2 Características de las bacterias

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 (Grattard, 1995)

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 carecen de pared celular, ya que son incapaces de sintetizar peptidoglicanos o sus precursores, y por ello son resistentes a la penicilina y a sus análogos. Sin embargo, son sensibles a la lisis por choque osmótico, detergentes, alcoholes y anticuerpos específicos. (Grattard, 1995)

Tabla I. Características de familia *Mycoplasmataceae* (Shepard, 1974).

Características	<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
Tamaño	0.30-0.40 μm	0.15-0.20 μm
Pared	No tiene	No tiene
Reino	Bacteria	Bacteria
Filo	Firmicutes	Firmicutes
Clase	Mollicutes	Mollicutes
Orden	Mycoplasmatales	Mycoplasmatales
Familia	Mycoplasmataceae	Mycoplasmataceae
Género	<i>Mycoplasma</i>	<i>Ureaplasma</i>
Especie	<i>M. hominis</i> , <i>M. genitalium</i> , <i>M. pneumoniae</i>	<i>U. urealyticum</i>

1.3. Epidemiología

Los índices de infección del tracto genital femenino por estos agentes, se relacionan con los de infección en neonatos (Waites, 2005). En 1989, en el Instituto Nacional de Perinatología, se realizó un estudio en la clínica de Infecciones de transmisión sexual, para conocer la etiología y prevalencia de las infecciones cervicovaginales por *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* el cual demostró la presencia de micoplasmas en 21.5% de las mujeres no embarazadas, así como su asociación directa con el uso de dispositivos intrauterinos y al número de parejas sexuales (Ortíz, 1989). En 1995, en la misma Institución, un estudio evidenció infección cervicovaginal por *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* en pacientes ginecológicas (1,783 casos analizados), se encontró 3.9% (71 casos) de positividad general, correspondiendo a *Mycoplasma hominis* el 64.7% de los aislamientos y a *Ureaplasma urealyticum* 35.3% (Casanova, 2004).

En México, ambos agentes se ha encontrado como causa de infección cervical en alrededor del 25% (Solís, 2006). En EUA, se ha identificado *Ureaplasma urealyticum* en el 40-80% de los cultivos cervicovaginales de mujeres en edad fértil y *Mycoplasma hominis* en el 21-53% (Casell, 1993). La transmisión infecciosa al neonato es por vía ascendente, secundaria a colonización de tracto genital materno, seguida por la transmisión transplacentaria, con índice de transmisión vertical: 18 – 55% entre recién nacidos. Se reporta de manera general que hasta un 25% de neonatos pueden ser colonizados por *U.u.* y *M.h.* (Remington, 2000). Lo que conduce a una prevalencia de neumonía por estos agentes en neonatos es de 9% (Arredondo, 1993).

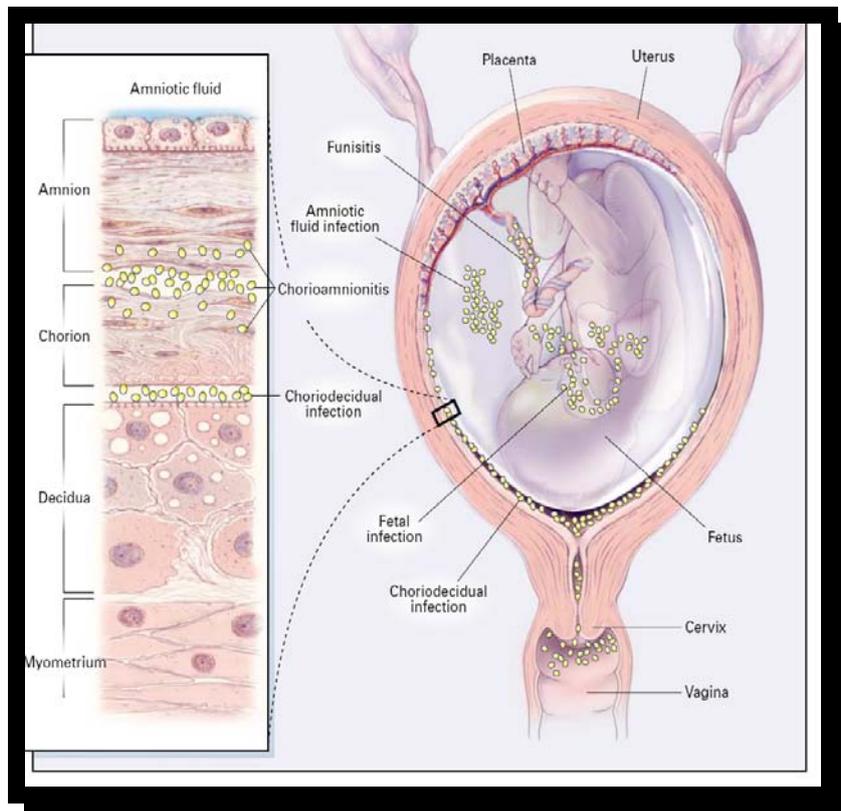


Figura 1: Transmisión vertical de infecciones (New Engl. J. Med, 2000)

1.4. Importancia clínica

Mycoplasma hominis y *Ureaplasma urealyticum* afectan primordialmente el tracto respiratorio bajo de neonatos. La manifestación clínica más común en el recién nacido es la neumonía intersticial con mayor riesgo de complicación en neonatos prematuros, con peso bajo al nacimiento, sujetos a ventilación mecánica **(Pereyre, 2001)**

Cabe mencionar que *M.h.* y *U.u.* han sido aislados de secreciones endotraqueales al momento de parto, en neonatos con evidencia de enfermedad respiratoria, así como también de secreciones endotraqueales se asocia frecuentemente con datos radiográficos de neumonía y aumento de PMN en el aspirado traqueal 2 días después del nacimiento **(Abele-Horn, 1997)**.

La neumonía generalmente da lugar a manifestaciones inespecíficas. Cuando la transmisión es “in útero”, se manifiesta a menudo en las primeras 24 horas de vida, los hallazgos clínicos más frecuentes son: polipnea y datos de dificultad respiratoria (manifestaciones inespecíficas). Los microclasma pueden cruzar membranas placentarias con facilidad **(figura 2)** y 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 inespecíficos, confundiéndose a menudo con enfermedad de membrana hialina **(Abele-Horn, 1997)**.

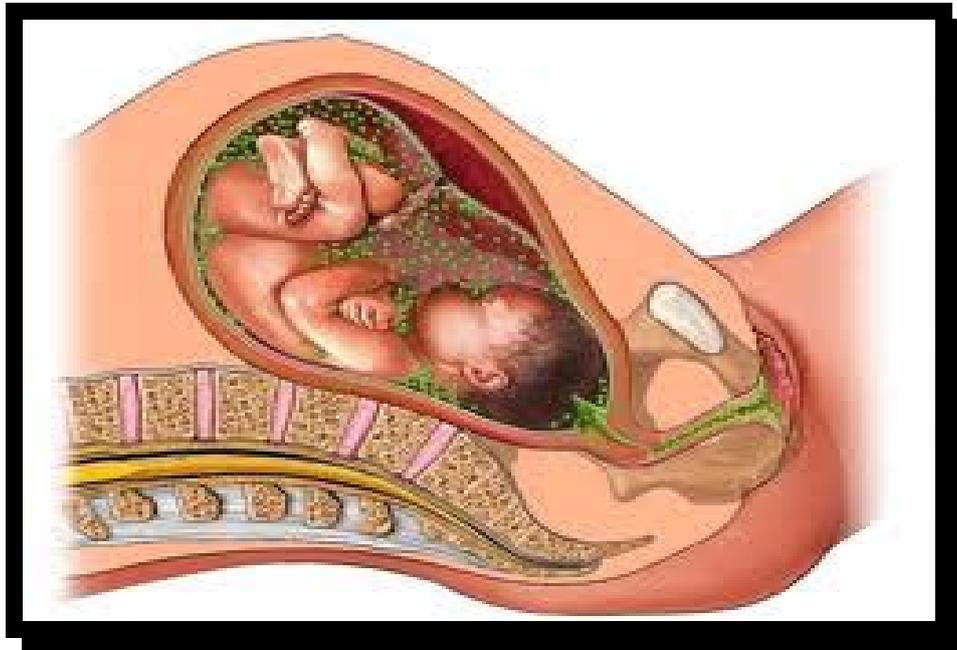


Figura 2: Factor de riesgo: La colonización bacteriana por micoplasmas es un factor medular en la infección in útero, algunas de estas bacterias pueden atravesar membranas placentarias intactas (Corioamnionitis. Medical Illustration, Human Anatomy Drawing)

1.5. Mecanismos de patogenicidad

La entrada de micoplasmas se inicia con la unión del patógeno a la membrana de la célula huésped, seguida por un reacomodo de microtubulos y microfilamentos que inducen la invaginación de la membrana y penetración con el microorganismo (**Universidad Simón Bolívar, 2000**). Una vez dentro de la célula tanto *U.u.* como *M.h.* inducen la génesis de fibrosis por migración de miofibroblastos, hay incremento en los niveles de elastina lo cual se exagera por la participación de $TNF-\alpha$, que induce liberación de factor de crecimiento $\beta 1$ (**Viscardi, 2010**)

Las bacterias del género *Mycoplasmateceae* producen varios factores de virulencia entre los que destacan:

-Adhesina P1: Proteína que se une con los residuos de ácido siálico de células epiteliales de tracto respiratorio generando una reacción inflamatoria local que altera el movimiento ciliar (**Rudd, 1989**).

-Generan productos metabólicos tóxicos: los micoplasmas son capaces de producir peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y anión superóxido (O_2^-), radicales libres que inducen peroxidación lipídica de las membranas de las células de epitelio respiratorio del huésped (**Rudd, 1989**).

-*Mycoplasma hominis* tiene capacidad de inhibir la catalasa de la célula huésped, lo cual da lugar a incremento en las concentraciones de H_2O_2 (**Rudd, 1989**).

La actividad inmunomoduladora hacia los linfocitos T y B, induce la producción de citocinas; que aumentan la citotoxicidad de macrófagos y células NK en consecuencia, también la expresión de receptores celulares lo que afecta la activación de la cascada de complemento, todos estos procesos contribuyen a que las infecciones causadas por los micoplasmas tiendan a la cronicidad. El primer mecanismo que tiene efecto sobre la supresión del sistema inmune se basa en el agotamiento de la arginina por un sistema de arginina-deshidrolasa, lo que limita la disponibilidad de nutrientes y precursores biosintéticos para la célula huésped. Los productos del metabolismo del género *Mycoplasma*, como los radicales reactivos de oxígeno han sido involucrados como agentes causantes de daño oxidativo en las membranas celulares. El amonio liberado por la hidrólisis de la urea de *Ureaplasma sp.* también se considera como un factor importante en el daño a tejidos (**Waites, 2005**).

Con respecto al efecto en tracto respiratorio, ambas bacterias inducen la citólisis de células de la tráquea, condicionando neumonía, aumento en el número de fibroblastos en pulmón y aumento en la síntesis de IL-6 y 8. La enfermedad pulmonar crónica es 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 (**Kotecha, 1996**).

En modelos animales se ha demostrado que los micoplasmas elevan significativamente la concentración de TNF- α y de IL-6, lo cual aumenta el riesgo de neumonía y enfermedad pulmonar crónica, aunque aún no se aclara el mecanismo por el cual se produce la enfermedad pulmonar. Sin embargo, se sugiere que los mediadores inflamatorios pueden ser la causa de 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 (**Jonson, 1997**).

1.6. Métodos diagnósticos

1.6.1. Métodos convencionales de diagnóstico

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.

Los micoplasmas 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. Actualmente el estándar de oro para el diagnóstico de infecciones por micoplasmas constituyen los cultivos en medios sólidos o líquidos.

1.6.1.1. Medios de cultivo

El diagnóstico definitivo de infección por micoplasmas se puede realizar mediante cultivo, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Atlanta (CDC, 1996), recomiendan diversos medios de cultivo para la recuperación de estos agentes, entre los que destacan:

- Agar A7 y A8: *Ureaplasma urealyticum*
- Agar SP4, Agar A7/ A8: *Mycoplasma hominis*
- Medios líquidos: caldo urea, caldo arginina y medio F líquido.

Los medios de cultivo para recuperar *Mycoplasma* y *Ureaplasma* a partir de muestras clínicas se basan en las propiedades de metabolizar urea por *Ureaplasma urealyticum* y arginina por *Mycoplasma hominis* (**Tabla 2**). Los medios de cultivo requieren de una gran variedad de complementos nutricionales los cuales incrementan el costo del estudio, entre ellos se pueden mencionar: antibióticos, suero equino y factores de crecimiento (extracto de levadura, sustrato metabólico). 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% (**Waites, 2001**).

Tabla 2. Especies de Micoplasmas, sitios de aislamiento y metabolismo (Taylor-Robinson, 1995)

ESPECIES	Cavidad	Tracto	Metaboliza
----------	---------	--------	------------

	Orofaringea	Genitourinario	Glucosa	Arginina	Urea
<i>Mycoplasma Hominis</i>	+	+	-	+	-
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	+	+	-	-	+
<i>Mycoplasma Genitalium</i>	+	+	+	-	-
<i>Mycoplasma fermentans</i>	+	+	+	+	-
<i>Mycoplasma Penetrans</i>	-	+	+	+	-

Una vez que se obtiene crecimiento de alguno de los agentes, al observar en microscopio su apariencia es pleomórfica. En medios sólidos *Mycoplasma spp.* forma colonias que varían su tamaño de 15 a 500 μm y se pueden observar a simple vista o a través de un microscopio óptico se puede apreciar la morfología típica en forma de huevo frito mientras que las colonias formadas por *Ureaplasma*, son más pequeñas y circulares con bordes irregulares, las cuales adquieren la forma de “erizo de mar” (figura 3) (Zu, 1997).

Figura A

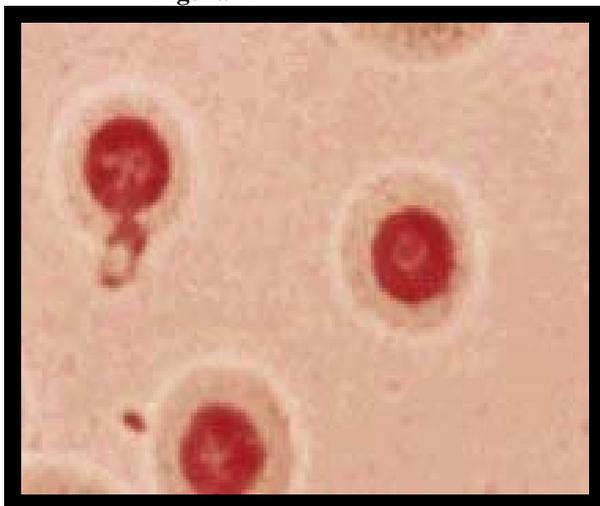


Figura B

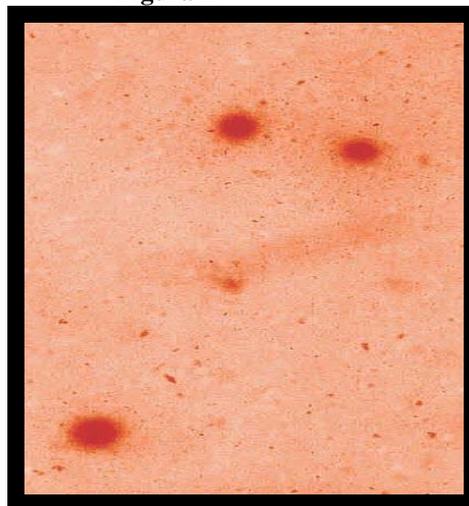


Figura 3. Morfología colonial de *M. hominis* y de *U. urealyticum*
Se observan colonias características con forma de “huevo frito” de *M. hominis* (A) y en forma de “erizo de mar” de *U. urealyticum* (B).

1.6.1.2. Diagnóstico molecular

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 DNA (**Watson, 2004**)

Fundamento e importancia: La técnica de PCR se fundamenta en la propiedad natural de las DNA polimerasas para replicar hebras de DNA, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de DNA recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas (**figura 4**). Actualmente, todo el proceso de la PCR está automatizado mediante un aparato llamado termociclador, que permite calentar y enfriar los tubos de reacción, controlando la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción. Los tubos usados para PCR tienen una pared muy fina, lo que favorece una buena conductividad térmica, permitiendo que se alcance rápidamente el equilibrio térmico. Casi todos los termocicladores tienen un sistema que calienta la tapa de cierre con el fin de evitar la condensación sobre los tubos de reacción. Los termocicladores más antiguos que carecían de este sistema, solucionaban el problema de la condensación con una capa de aceite en la parte superior de la mezcla de reacción o con un poco de cera dentro de los tubos (**Joseph, 2001- Mathews, 2003**). La PCR se ha convertido en una técnica común e indispensable en laboratorios de investigación médica y biológica para una gran variedad de aplicaciones. Entre ellas se incluyen la clonación de DNA para la secuenciación, la filogenia basada en DNA, el análisis funcional de genes, el diagnóstico de trastornos hereditarios, la identificación de huellas genéticas y la detección y diagnóstico de enfermedades infecciosas 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 (Pérez de Castro, 2007).

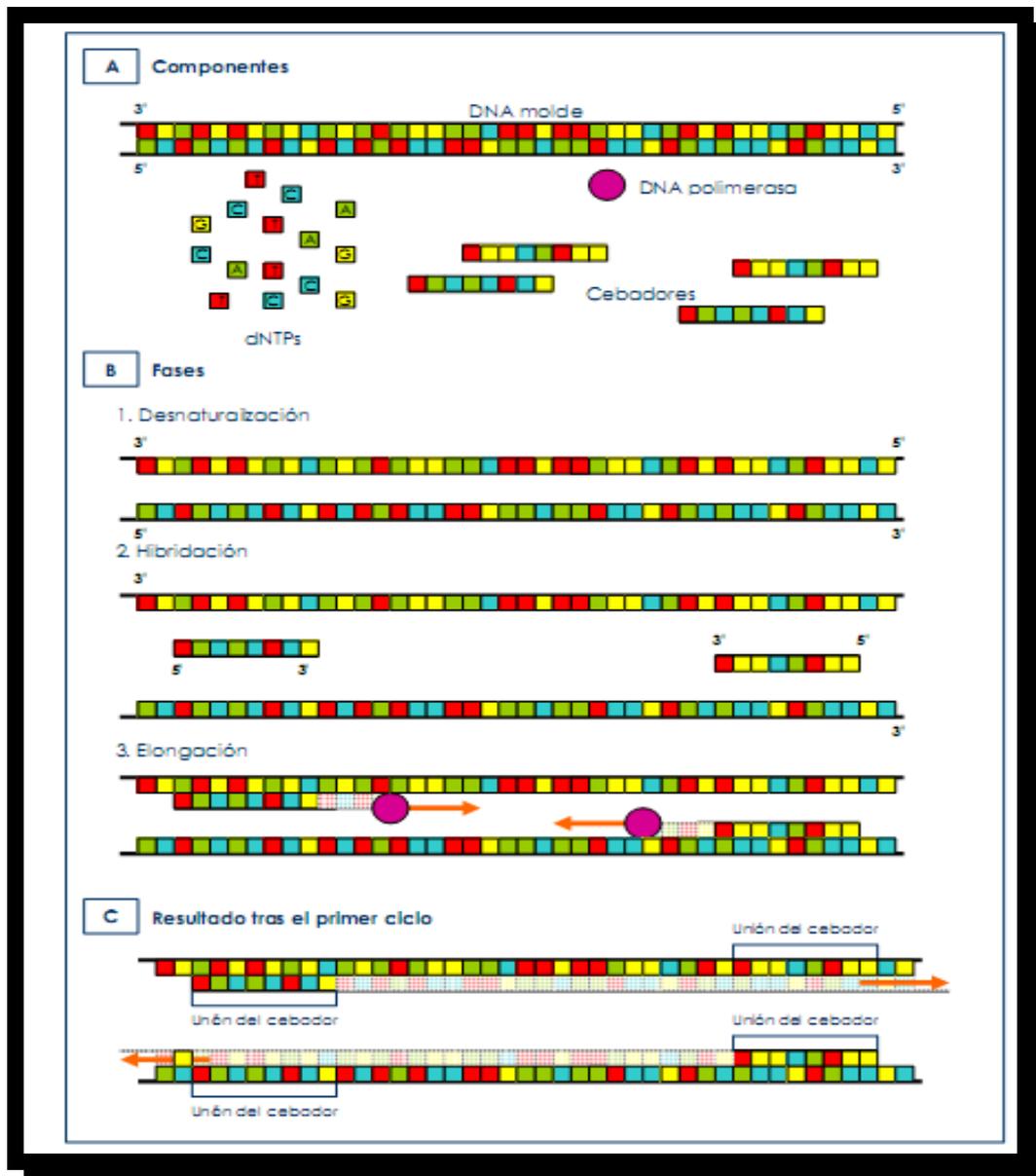


Figura 4: Representación esquemática PCR: A. Componentes básicos para llevar a cabo una PCR. B. Fases de la PCR. C. Resultado obtenido tras el primer ciclo de amplificación (Pérez de Castro, 2007)

1.6.2. Métodos alternativos de diagnóstico

1.6.2.1. *Mycofast Evolution 3*

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 espermatozoides, 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 (**Elitech Group. France, 2003**)

1.6.2.1.1. Fundamento de la prueba

Identifica el crecimiento de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* después de 24 horas de incubación en medio líquido. *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 CO_2 y NH_3 . La liberación de amoníaco en grandes cantidades puede ocasionar depleción de arginina *in vitro* lo cual resuelta en un efecto citotóxico. La liberación de NH_3 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 (**figura 5**). El resultado 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 amoníaco 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* (Elitech Group. France, 2003).

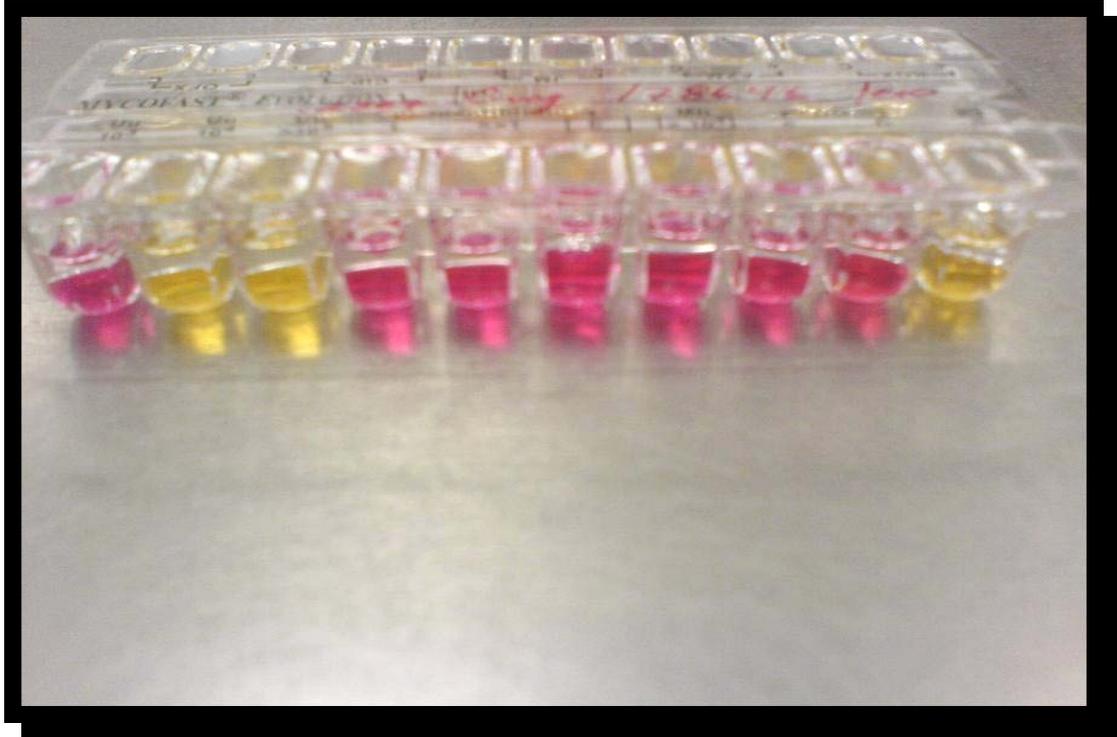


Figura 5: Fundamento de prueba *Mycofast Evolution 3*: El metabolismo bacteriano induce cambio en la coloración del medio de amarillo a rosa por liberación de NH_3 . El cambio de coloración indica resultado positivo

La participación de las enzimas ureasa en *U.u.* y arginasa de *M.h.* son fundamentales en el principio básico de Mycofast Evolution 3, caldo urea y caldo arginina, debido a que a través de reacciones de hidrólisis, se genera la liberación de amoníaco al medio lo cual torna el pH de la solución a alcalino y condiciona el viraje de color de amarillo a rojo por participación del colorante rojo fenol (Cortés, 2010)

Principio básico de la ureasa: hidrólisis de urea a dióxido de carbono y amoníaco. La reacción se ejemplifica en la figura 6:

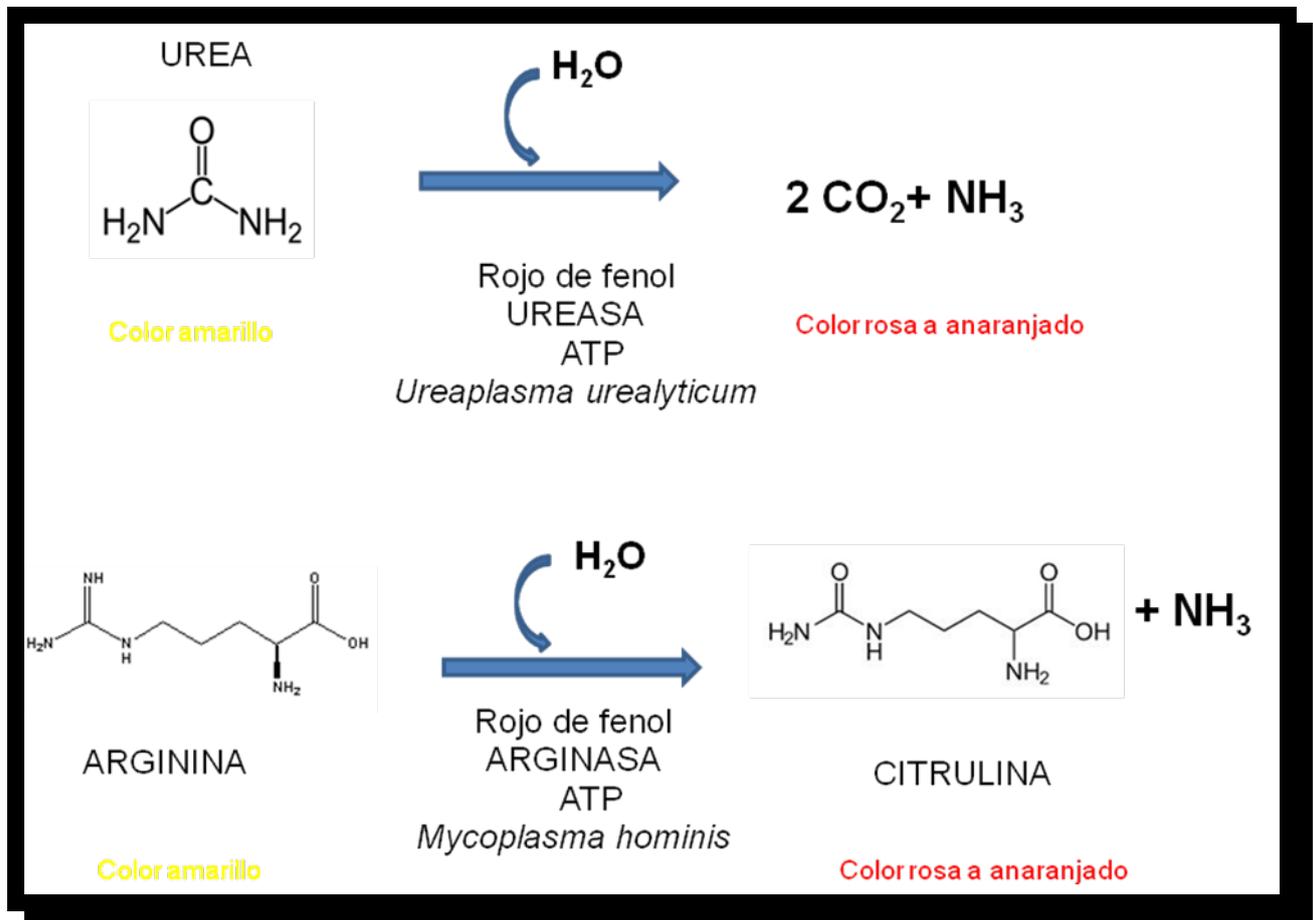


Figura 6: Principio básico de la Prueba Mycofast Evolution 3, caldo urea y arginina: Metabolismo bacteriano de urea (por *Ureaplasma*) y arginina (*Mycoplasma*) a través de una reacción de hidrólisis.

1.6.2.1.2. 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 (Elitech Group. France, 2003).

1.6.2.1.3. 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) **(Wescor, EUA 2003)**.

Para la comparación de la concordancia global entre los 2 métodos es 97,8%.

Las concentraciones muy altas $\geq 10^6$ UFC/ml de *U. urealyticum* fueron capaces de provocar cambio de color en el pozo 6 (E) **(Elitech Group, France, 2003)**.

1.7. Composición química de diferentes líquidos biológicos

1.7.1. 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 **(Guyton- Hall, 2000)**.

1.7.2. 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 **(Rhoades, 1997)**

1.7.3. 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, *Trichomonas vaginalis*, esporas, y células guías (**Berne, 2001**). 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 (**Faro, 1993**).

1.7.4. 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 ácido clorhídrico secretado por la mucosa. La mucosa secreta también un enzima proteolítico llamado pepsina y dos diferentes tipos de mucus: uno soluble y otro insoluble en agua. El jugo gástrico contiene gran cantidad de agua, electrólitos (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 (**Gannong, 2001**).

1.7.5. 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 (**Guyton, 2000**)

1. 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 (**Guyton, 2000**).

2. 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 **(Guyton, 2000)**.
3. La más profunda formada por glucoproteínas que cumplen la función de sostén dentro de la constitución del moco **(Guyton, 2000)**.

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 **(Gannong, 2001)**.

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 **(Gannong, 2001)**. 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 **(Tresguerres, 1999)**.

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 **(Best, 1993)**

2- JUSTIFICACIÓN

Ureaplasma urealyticum y *Mycoplasma hominis* son microorganismos que han sido identificados en sepsis, neumonía y meningitis neonatal, generando un elevado índice de morbilidad y mortalidad. El método tradicional de diagnóstico (caldo urea y arginina) presenta el inconveniente de otorgar resultados en un largo período de tiempo. La prueba de detección rápida *Mycfast Evolution 3*, identifica el crecimiento de *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis* por lo que constituye una herramienta diagnóstica 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, ya que no se ha probado en muestra de aspirado bronquial para la detección de agentes atípicos. La reacción en cadena de polimerasa puede amplificar el material genético de dichas bacterias en pocas horas, sin embargo, no está disponible en muchos medios hospitalarios, resulta costosa, y se requieren varias muestras para iniciar el proceso (costo-beneficio).

En el Instituto Nacional de Perinatología, *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* han sido ampliamente estudiados por su potencial abortivo, por ello consideramos importante contar con un método diagnóstico rápido y eficaz para la identificación de éstos microorganismos.

3.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La prueba de *Mycfast Evolution 3* puede realizarse de manera individual, y proporciona resultados en 24 horas. Éste método se ha utilizado en muestras

de secreción vaginal, semen, jugo gástrico, pero no en secreciones bronquiales. En consecuencia, no se han analizado por pruebas de concordancia los resultados de secreciones bronquiales por las pruebas de *Mycofast Evolution 3*, PCR y estándar de oro (cultivos en medios líquidos).

4.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la Concordancia entre PCR punto final, caldos de cultivo y la prueba de detección rápida *Mycofast evolution 3* para identificar *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis* en aspirado bronquial de neonatos?

5.- HIPÓTESIS DE TRABAJO

La prueba de detección rápida *Mycofast Evolution 3*, tiene una concordancia mayor al 80% con respecto a la reacción en cadena de la polimerasa para la Identificación de *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis* en muestras de aspirado bronquial.

6.- OBJETIVOS

6.1.- OBJETIVO GENERAL

- Determinar la concordancia entre la prueba de detección rápida y PCR punto final para identificar *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* en secreciones de aspirado bronquial
- Determinar la concordancia entre PCR y caldo arginina/ urea para identificar *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* en secreciones de aspirado bronquial

6.2.- OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor

predictivo negativo, cociente de probabilidad positivo y negativo de *Mycfast Evolution 3* en muestras de secreción bronquial.

- Comparar los resultados de validez y seguridad de *Mycfast Evolution 3* con el estándar de oro y con PCR punto final.

7.- DISEÑO METODOLOGICO

Clasificación del tipo de Estudio (Argimón, 2006)

- Finalidad del estudio: **Descriptivo.**
- Secuencia temporal: **Transversal.**
- Control de la asignación: **Observacional.**
- Inicio del estudio en relación a la cronología: **Prospectivo.**

Corresponde a un estudio de prueba diagnóstica: Habitualmente, se entiende por prueba diagnóstica, aquella realizada en un laboratorio, y el controlar ciertos factores le da una mayor solidez a los resultados de la misma. Una propiedad fundamental de las pruebas diagnósticas es la exactitud, y esta propiedad se relaciona con la manera de comprobar si la enfermedad está realmente presente o no, es decir, una indicación firme de la verdad, denominada patrón de referencia, por lo que la comparación de una prueba diagnóstica con el estándar de referencia es fundamental (**Fletcher, 2007**)

8.- UNIVERSO DE ESTUDIO

-Muestra de aspirado bronquial de neonatos Hospitalizados en Unidad de Cuidos Intensivos Neonatales del Instituto Nacional de Perinatología (**figura 7**).



Figura 7: Recién nacido hospitalizado en Unidad de Cuidados Intensivos neonatales del INPer IER, con ventilación mecánica, 2011).

9.- CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LA MUESTRA

Criterios de Inclusión

- Muestra de aspirado bronquial de neonatos que se encuentren orintubados, a los que se les pueda tomar muestra de aspirado bronquial.
- Que cuenten con consentimiento informado firmado por los padres o tutores.

Criterios de Exclusión

- Muestras de aspirado bronquial de pacientes tratados **previamente con macrólidos.**

Criterios de Eliminación

- Muestras de aspirado bronquial de neonatos que fueron solo inoculadas en cultivos tradicionales sin realización de procedimiento en Mycofast evolution 3 y PCR punto final o quedasen inconclusas

10.- VARIABLES

No aplica el concepto de variable dependiente e independiente en este caso, por tratarse de una prueba diagnóstica. Por lo que sólo se categorizan las siguientes variables (Tabla 3):

Tabla 3. Categorización de variables

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL
Caldo urea y caldo arginina (Cultivos medio líquido)	Cualitativa nominal Dicotómica	Se consideran prueba de oro para el diagnóstico de agentes pertenecientes a la clase <i>Mollicutes</i> , medios de cultivo líquidos de enriquecimiento.
<i>Mycofast Evolution 3</i>	Cualitativa nominal Dicotómica	Prueba de detección rápida, que se basa en concentraciones elevadas de sustratos necesarios para el metabolismo de micoplasmas.
Reacción en cadena de la polimerasa punto final	Cualitativa nominal Dicotómica	Método de biología molecular que permite amplificar fragmentos de DNA, por acción de la DNA polimerasa.

11.- DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO:

Se recolectan de 1-3ml de aspirado bronquial, y se coloca en un frasco estéril para procesar por los 3 diferentes métodos diagnósticos.

La muestra de aspirado es fracciona en 2 porciones: una de ellas será inoculada con cepa de referencia de *Ureaplasma urealyticum* (ATCC 27813) y 50 µL de la cepa de referencia de *Mycoplasma hominis* (ATCC 1548). Por cada 300 µL de aspirado bronquial se adicionan 50 µL de cada

una de las cepas, con esta dilución se obtienen 10^5 UFC/ ml de muestra, de cada una de las bacterias. En la otra porción de la muestra de aspirado no se inocular nada.

Procedimiento para Mycofast Evolution 3

- Se inocula un vial conteniendo el medio UTMt, con 300 μ l de aspirado bronquial homogeneizado.
- Una vez que se tiene la suspensión de la muestra, se transfiere todo el volumen al medio UMMlvo, inoculados con ambas cepas de referencia para *Ureaplasma urealyticum* (ATCC 27813) y *Mycoplasma hominis* (ATCC 1548).
- Se inocula la microplaca del sistema *Mycofast evolution 3* con 100 μ L de la suspensión de la muestra.
- A los pozos marcados con las siglas E pozo 6 y Mh pozo 7, se le adiciona 50 μ L del suplemento S.Mh (**tabla 4**)

Tabla 4: Inoculación de la microplaca

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

- Se aplican 2 gotas de aceite de parafina estéril a cada uno de los pozos y se sella la microplaca con una película adhesiva para evitar contaminación.
- Se incuba la microplaca a 37°C de 24- 36 horas.
- Finalmente, se revisa la microplaca a las 24 horas.

LECTURA E INTERPRETACIÓN DE MYCOFAST EVOLUTION 3:

- 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 (Figura 8).

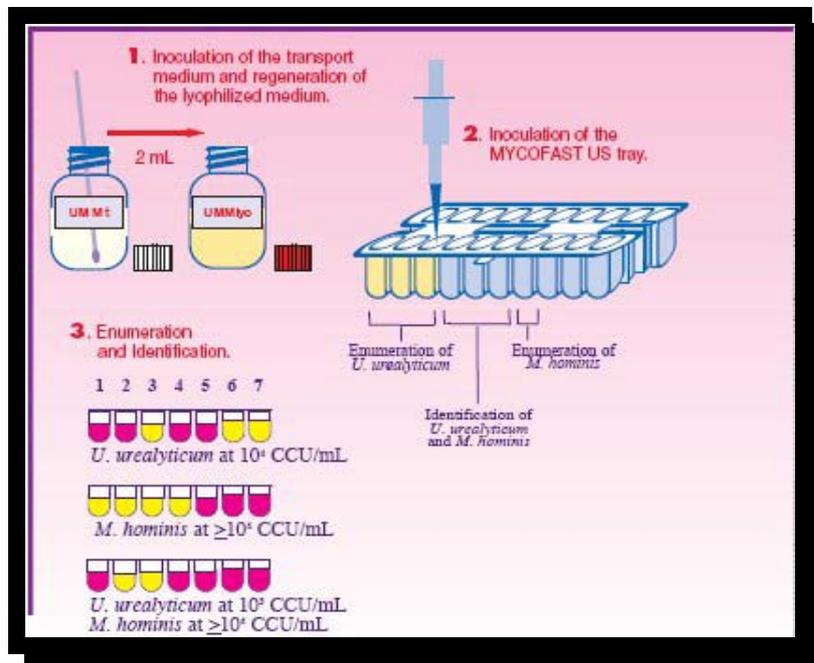


Figura 8: Lectura de los resultados *Mycofast Evolution 3*:

Amarillo = Negativo - Rosa = 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 #**

Tabla 5. Susceptibilidad a antimicrobianos de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma Urealyticum*

MICROORGANISMO	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 como se aprecia en la tabla 6.

Tabla 6. Interpretación del panel, por crecimiento bacteriano

Color rojo observado en el pozo #	Interpretación (UCC / ml)
1	<i>U.u</i> valor 10^3
1 y 2	<i>U.u</i> valor 10^4
1,2 y 3	<i>U.u.</i> $\geq 10^5$
7	<i>M.h.</i> 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 antimicrobiano a la concentración probada. El color amarillo en el pozo indica la ausencia de desarrollo bacteriano y susceptibilidad al antimicrobiano probado a una concentración determinada.

PROCEDIMIENTO CON CALDO UREA Y ARGININA

De la muestra de aspirado previamente inoculada con cepas de referencia, se tomaron 100 uL de muestra y se inoculan en caldo urea, de la misma manera se tomaron 100 uL más, para adicionar a caldo arginina (controles positivos),

se incuban a 37°C en un ambiente de CO₂, durante 5-14 días. Se revisa diario para analizar cambio de coloración. El mismo procedimiento se efectúa con los controles negativos (sin cepa).

- Los caldos que muestran cambio de color, por el viraje hacia pH alcalino y tengan turbidez en el medio fueron filtrados a través de una membrana de 0.45 µm y se inocula a un nuevo caldo con el filtrado colocando un volumen de 100 uL.
- Se incuban los tubos de ensaye con el caldo de cultivo a 37°C en un ambiente de CO₂ durante 5-14 días.

PROCESAMIENTO CON TÉCNICA PCR

Para realizar la técnica PCR se requiere una extracción previa de DNA, la cual se lleva a cabo por la técnica de fenol- cloroformo (**Técnica estandarizada laboratorio de Biología molecular INPer IER, 2011**)

Con el resto de la muestra inoculada con ambas cepas de referencia, se toma una alícuota de 300 µl de la muestra y se colocará en tubos estériles tipo Ependorff y a continuación se efectúan los siguientes pasos:

- El botón celular se resuspende en agua.
- La integridad del DNA se verifica corriendo un gel de agarosa al 1% a 75 V/40 min revelado con una solución de bromuro de etidio al 2%.
- Una vez obtenido el DNA de las muestras se realiza la detección de los micoplasmas, con distintos iniciadores

- Una vez preparadas las muestras se transfieren a un termociclador, previamente programado bajo las condiciones predeterminadas.

(Laboratorio de Biología molecular INPer IER, 2011)

PROCEDIMIENTO GENERAL PCR:

Ciclo de amplificación

- El proceso de PCR consiste en una serie de 20 a 35 cambios repetidos de temperatura llamados ciclos **(Sambrook, 2001)**.
- La PCR común se realiza con ciclos que tienen tres pasos de temperatura. **(Sambrook, 2001)**.
- Los pasos de ciclos a menudo están precedidos por un choque térmico a alta temperatura (> 90 °C) **(Sambrook, 2001)**.

Inicio

- Consiste en llevar la reacción hasta una temperatura de 94-96 °C, se mantiene durante 1-9 minutos. Esto sólo es necesario para DNA polimerasas que requieran activación por calor **(Sambrook, 2001)**.

Desnaturalización

- Se desnaturaliza el DNA mediante el calentamiento a 94-95 °C de la muestra la forma más habitual **(Sambrook, 2001)**.
- La temperatura para realizar la desnaturalización depende de la proporción de G+C que tenga la hebra de la longitud de la misma. **(Sambrook, 2001)**.

Alineamiento o unión del cebador

A continuación se producirá la hibridación del cebador, en la cual, el cebador se unirá a su secuencia complementaria en el DNA molde. Para ello es necesario bajar la temperatura a 40-68 °C durante 20-40 segundos (según el caso), permitiendo así el alineamiento. Los puentes de hidrógeno estables entre las cadenas de DNA (unión DNA-DNA) sólo se forman cuando la secuencia del cebador es muy similar a la secuencia del DNA molde. La polimerasa une el híbrido de la cadena molde y el cebador, y empieza a sintetizar DNA. Los cebadores actuarán como límites de la región de la molécula que va a ser amplificada (**Sambrook, 2001**). Los cebadores o primers utilizados son los siguientes (tabla 7):

Tabla 7. Cebadores utilizados en la fase de alineamiento para la amplificación de material genético de micoplasmas (Laboratorio de Biología Molecular INPer IER, 2011)

Microorganismo	Secuencia (sentido/ antisentido)	Fuente
<i>Mycoplasma hominis</i>	Sentido 5´ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA´3 GPO-1 Antisentido 5´TGCACCATCTGTCACTCTGTAACTC´3 (715bp) MGSO	Lab. BM INPer
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Sentido 5´CAATCTGCTCGTGAAGTATTAC´3 U5 Antisentido 5´ACGACGTCCATAAGCAACT´3 (429bp) U4	Lab. BM INPer

Extensión o elongación de la cadena

Actúa la DNA polimerasa, tomando el DNA molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial necesario para la síntesis de nuevo DNA. La polimerasa sintetiza una nueva hebra de DNA complementaria a la hebra molde añadiendo los dNTP complementarios en dirección 3'→ 5', uniendo el grupo 5'-fosfato de los dNTP con el grupo 3'-

hidroxilo del final de la hebra de DNA creciente (la cual se extiende). La temperatura para este paso depende de la DNA polimerasa que usemos. Para la Taq polimerasa, la temperatura de máxima actividad está en 75-80 °C **(Sambrook, 2001)**.

Elongación final

Esta etapa se lleva a cabo a una temperatura de 72 °C durante 5-15 minutos tras el último ciclo de PCR. Con ella se asegura que cualquier DNA de cadena simple restante sea totalmente ampliado **(Sambrook, 2001)**

Para verificar que la PCR ha generado el fragmento de DNA previsto, se emplean técnicas de electroforesis, que separan los fragmentos de DNA generados de acuerdo a su carga y dependiendo del tamaño del poro de la matriz empleada, a su tamaño: típicamente se emplean la electroforesis en gel de agarosa. En este caso los productos de la amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, revelado con bromuro de etidio al 0.1% para ser evaluado en un analizador de imágenes. El mismo procedimiento se efectuó para cada una de las muestras sin cepa de referencia **(Sambrook, 2001)**.

Programación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Figura 9: Procedimiento general de las fases de reacción en cadena de polimerasa

12.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Se calcula sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y cociente de probabilidad positivo y negativo (cocientes de verosimilitud) a la prueba de detección rápida Mycofast Evolution 3, PCR y medios de cultivo. Tomando en cuenta los siguientes conceptos:

- **Sensibilidad:** Es la capacidad de una prueba de obtener un resultado positivo, cuando la muestra proviene de un paciente que tiene la enfermedad. La sensibilidad es, por lo tanto, la capacidad del test para detectar la enfermedad, de acuerdo a la siguiente fórmula (**Pita, 2003**):

$$Sensibilidad = \frac{VP}{VP + FN}$$

- **Especificidad:** Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la probabilidad de que en un sujeto sano se obtenga un resultado negativo. En otras palabras, se puede definir la

especificidad como la capacidad para detectar a los sanos, de acuerdo a la siguiente fórmula (Pita, 2003):

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$$

*La **Validez** de una prueba diagnóstica se refiere al grado en que una prueba mide lo que se supone que debe medir, la frecuencia en que el resultado de la prueba es confirmado por procedimientos diagnósticos más complejos y rigurosos. La sensibilidad y la especificidad de una prueba diagnóstica son medidas de su validez (Pita, 2003):

Por otro lado, la **seguridad** de una prueba diagnóstica está determinada por el valor predictivo de la presencia o ausencia de enfermedad. En otras palabras, cuando se tiene un resultado positivo de una prueba la seguridad de la misma determinará la probabilidad que existe de que este resultado indique presencia de la enfermedad. El valor predictivo positivo y negativo de una prueba, son medidas de su seguridad (Pita, 2003):

- **Valor predictivo positivo:** Es la probabilidad de padecer la enfermedad si se obtiene un resultado positivo en el test. El valor predictivo positivo puede estimarse, por tanto, a partir de la proporción de pacientes con un resultado positivo en la prueba que finalmente resultaron estar enfermos, de acuerdo a la siguiente fórmula (Pita, 2003):

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$$

- **Valor predictivo negativo:** Es la probabilidad de que un sujeto con un resultado negativo en la prueba esté realmente sano. Se estima

dividiendo el número de verdaderos negativos entre el total de pacientes con un resultado negativo en la prueba, de acuerdo a la siguiente fórmula (**Pita, 2003**):

- **Razón de verosimilitudes positiva o cociente de probabilidades positivo:** se calcula dividiendo la probabilidad de un resultado positivo en los pacientes enfermos entre la probabilidad de un resultado positivo entre los sanos. Es, en definitiva, el cociente entre la fracción de verdaderos positivos (sensibilidad) y la fracción de falsos positivos (1-especificidad), de acuerdo a la siguiente fórmula (**Pita, 2003**):

$$RV = \frac{\textit{Sensibilidad}}{1 - \textit{Especificidad}}$$

- **Razón de verosimilitudes negativa o cociente de probabilidades negativo:** se calcula dividiendo la probabilidad de un resultado negativo en presencia de enfermedad entre la probabilidad de un resultado negativo en ausencia de la misma. Se calcula por lo tanto, como el cociente entre la fracción de falsos negativos (1-sensibilidad) y la fracción de verdaderos negativos (especificidad), de acuerdo a la siguiente fórmula (**Pita, 2003**):

$$RV = \frac{1 - \textit{Sensibilidad}}{\textit{Especificidad}}$$

El esquema básico para el cálculo de la validez y seguridad de las pruebas diagnósticas se basa en la construcción de un cuadro tetraecoico (tabla de contingencia 2x2) como se ejemplifica en la figura 10 (Molinero, 2002):

		Patología		
		Enfermo E+	Sano E-	
Prueba	Positivo T+	a	b	Positivos $N_p = a+b$
	Negativo T-	c	d	Negativos $N_n = c+d$
		Total enfermos $N_e = a+c$	Total sanos $N_s = b+d$	Total N

Figura 10: Tabla de contingencia de 2x2, para la determinación de validez y seguridad de una prueba diagnóstica (Molinero LM, 2002)

Se efectuó determinación de concordancia, entre las 3 diferentes pruebas diagnósticas estudiadas en este protocolo. El término concordancia se deriva de la expresión latina concordare, cuyo significado hace referencia a que hay 'correspondencia o conformidad de una cosa con otra'. Su importancia en el área de la salud reside en que existen diversas maneras de valorar los fenómenos de la naturaleza y por lo tanto aparecen distintas aproximaciones o métodos diagnósticos usados para medir los mismos fenómenos o enfermedades. Por lo tanto, la concordancia adquiere importancia cuando se desea conocer si con un método o instrumento nuevo, diferente al habitual, se obtienen resultados equivalentes de tal manera que eventualmente uno y otro puedan ser remplazados o intercambiados ya sea porque uno de ellos es más sencillo, menos costoso y por lo tanto más costo-efectivo, o porque uno de ellos resulta más seguro para el paciente, entre otras múltiples razones. En términos generales, la concordancia es el grado en que dos o más observadores, métodos, técnicas u observaciones están de acuerdo sobre el mismo fenómeno observado (Rubio, 2010).

La exactitud con que las pruebas orientan hacia un diagnóstico correcto es una de las premisas medulares de la prueba, al igual que la consistencia, en la cual se determinan los grados de acuerdo entre un mismo observador (intraobservador) o entre diferentes evaluadores (interobservador) al interpretar determinado examen **(Cerdea, 2008)**.

13.- CALCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA:

En el caso de los estudios de prueba diagnóstica, el cálculo del tamaño de muestra se basa en principios diferentes, son estudios descriptivos, en los cuales las variables son dicotómicas, en este tipo de estudios, no hay variables predictoras ni de resultado (variable independiente-dependiente), cabe mencionar, que en estos estudios, tampoco aplican los conceptos de hipótesis nula y alternativa **(Hulley, 2007)**.

En este caso se utilizó la fórmula general:

$$N= 4z\alpha^2 P(1-P) \div W^2$$

En la cual se tomó en cuenta una proporción esperada de 0,10 (P), con amplitud deseada del intervalo de confianza de 0,10 (W). En donde N, se refiere al número total de la muestra, $z\alpha$ es la desviación normal estándar para una α bilateral **(Hulley,2007)**.

Por lo tanto, el tamaño de muestra definitivo en este protocolo fue:

- **58 muestras a las que se inoculó cepas de referencia**
- **58 muestras a las que no se inoculó cepas de referencia**
- **Se deben procesar un mínimo total de 116 muestras.**

*A cada muestra que control, se inocularon cepas ATCC tanto de *M. hominis* como de *U. urealyticum*.

14.- RECURSOS PARA LA REALIZACION DEL PROYECTO:

RECURSOS HUMANOS:

- Un investigador principal
- Un asesor clínico y metodológico
- Un asesor microbiológico
- Un asesor especialista en Biología Molecular.

RECURSOS MATERIALES PARA PROCESAMIENTO DE MYCOFAST E3 Y CALDO UREA/ ARGININA:

- 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.
- Marcadores.
- Cánula de aspirado.
- Recipiente estéril.
- *Kit Mycofast evolution 3.*
- *Caldo Urea y caldo arginina.*

RECURSOS MATERIALES PARA LA REALIZACIÓN DE REACCION EN CADENA DE POLIMERASA

- **EQUIPO**

- Vórtex.
- Termociclador punto final.
- Cámara de Electroforesis.
- Analizador de imágenes.
- Fuente de poder.

- **REACTIVOS:**

- Master mix (incluye todos los componentes requeridos para la realización de la PCR).
- Cebadores.
- Marcador de peso molecular.
- Cloruro de magnesio.
- Bromuro de etidio.
- Marcador de corrimiento.

15.- COMITÉ DE BIOÉTICA:

De acuerdo al artículo 17 de la Ley General de Salud, Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos, se cataloga como una Investigación con riesgo mínimo ya que en este caso, los procedimientos que se efectúan en el neonato (aspirado bronquial), son rutinarios (colección de secreciones) y este aspirado se efectúa por indicación terapéutica (**Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud**).

Se obtuvo consentimiento informado el cual será firmado por los padres o tutores para la obtención de la muestra de aspirado bronquial (**Anexo 1**)

16.- RESULTADOS:

En el periodo comprendido de Enero del 2010 a junio de 2011 se analizaron un total de **128 muestras**: 64 con cepa de referencia ATCC y 64 sin la misma (control negativo) correspondientes al mismo paciente, todas las muestras se obtuvieron de pacientes que se encontraban en fase III de ventilación mecánica, en unidad de cuidados intensivos e intermedios neonatales.

De los 64 pacientes en los que se obtuvo muestra (cada muestra se fraccionó en 2, para obtener control positivo y negativo), 34 corresponden a pacientes del género femenino (53,12%) y 30 (46,88%) a pacientes del género masculino (**Gráfico I**).



Gráfico I: Pacientes muestreados por género

La edad gestacional de los pacientes abarcaron un rango de 26 a 38 semanas de gestación, con un promedio de 31,5 SDG (tabla). La muestra se obtuvo en productos de muy diversas edades gestacionales, sin embargo, la gran

mayoría de muestras de aspirado bronquial se obtuvieron en pacientes prematuros de 28 a 36 SEG (**Gráfico II**):

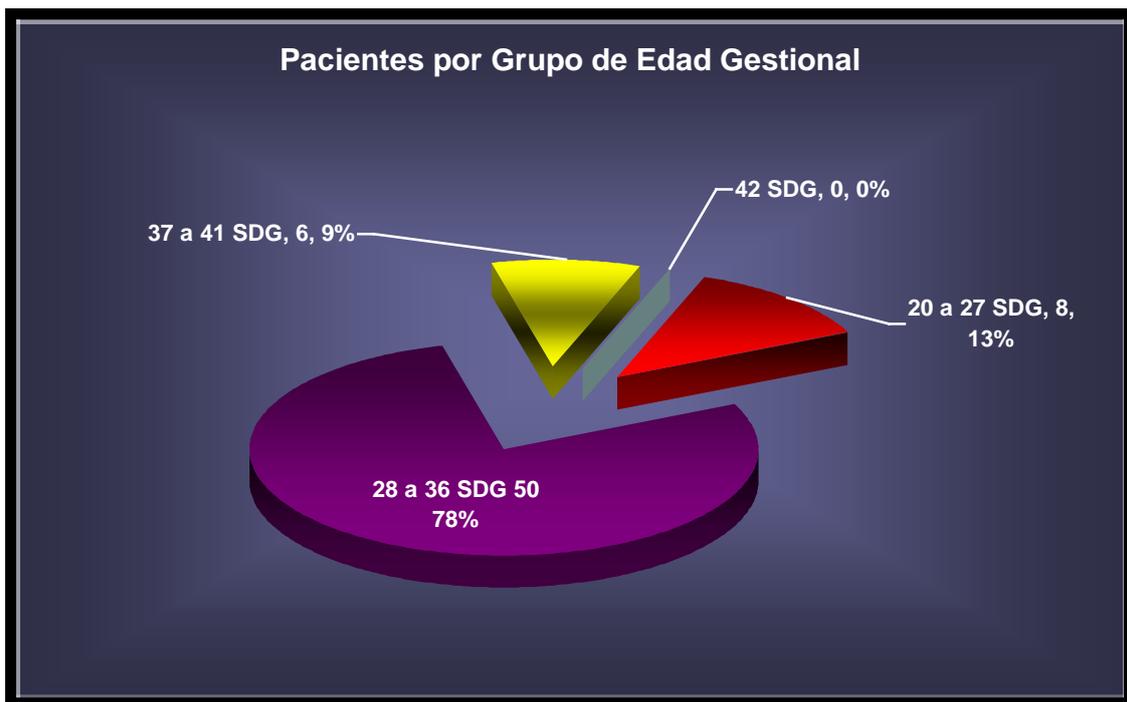


Gráfico II: Pacientes por grupo de edad gestacional.

Los rangos de peso oscilaron de 660 gramos a 3200gramos, con un promedio de peso de los pacientes muestreados de 2820,31 gramos. Los días de vida extrauterina en que se tomaron las muestras en los pacientes oscilaron entre 1 y 65, con un promedio de 25,86 días. La muestra se obtuvo de pacientes con muy diversos diagnósticos, muchos de ellos, no contaban con patología de origen infeccioso, sin embargo, sólo se necesitaba muestra de aspirado bronquial de pacientes que no estuviesen bajo tratamiento antimicrobiano con macrólidos, ya que la muestra se procesó bajo medidas de control, para inoculación de cepas bacterianas y probar si el reactivo sirve para diagnosticar la presencia de estas bacterias en la muestra biológica propuesta (secreción bronquial). Los diagnósticos registrados en los pacientes objeto de toma de muestra, fueron los siguientes (**Gráfico III**):

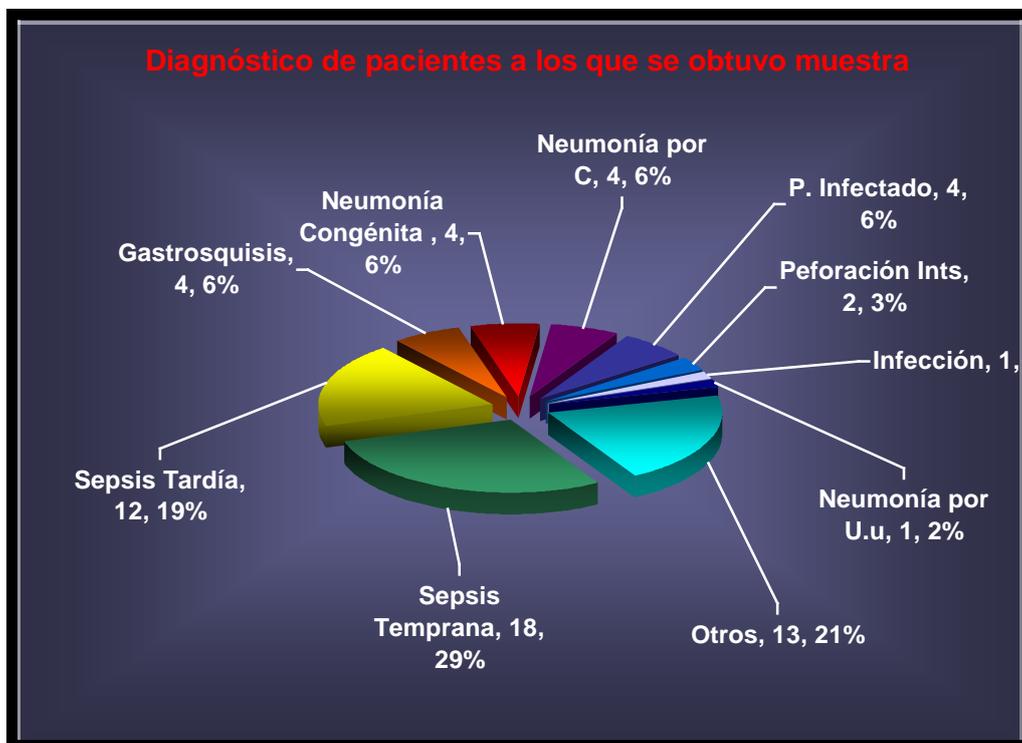


Gráfico III: Diagnósticos de los pacientes objeto de toma de muestra

De los 64 pacientes analizados, en 51 se utilizaron distintos esquemas antimicrobianos, con fines terapéuticos y profilácticos, los esquemas utilizados se muestran en la tabla 8:

Tabla 8: Esquemas antimicrobianos utilizados en los pacientes participantes en este protocolo		
Esquemas antimicrobianos	No. de pacientes	Porcentaje %
Ampicilina/ amikacina	22	34,37
Ampicilina/ amikacina/ cefotaxima/ vancomicina	6	9,37
Cefotaxima/ vancomicina	10	15,62
Cefotaxima/ vancomicina/metronidazol	7	10,93
Claritromicina*	5	7,81
Cefotaxima/vancomicina/meropenem/amikacina	1	1,56
Sin antimicrobianos	13	20,31
Total	64	100

*El antimicrobiano claritromicina se indico a 4 casos de neumonía por *C. trachomatis* y un caso de neumonía por *U.urealyticum* el manejo se inició después de la toma de muestras de aspirado bronquial, por lo que no repercute en los resultados obtenidos.

De los antimicrobianos utilizados en los pacientes objeto de estudio para toma de muestra, tenemos diferentes grupos: β -lactámicos (aminopenicilina, carbapenémicos), glucopéptidos, aminoglucósidos, nitroimidazoles y macrólidos. Los 2 primeros grupos de antimicrobianos, tiene efecto bactericida por inhibición de la síntesis de pared celular bacteriana. Los micoplasmas, por

carecer de pared celular, no se ven afectados por estos agentes, por lo cual no hay riesgo de alteración o modificación de los resultados. En el caso de antecedente de uso de aminoglucósidos (amikacina) y nitroimidazoles (metronidazol), no tienen espectro contra estas bacterias, por el contrario, los macrólidos (claritromicina), si ejercen un efecto bactericida en los micoplasmas por inhibición de la síntesis de proteínas bacterianas, al unirse de manera reversible al dominio V del RNA ribosomal bacteriano 23 S (**Zuckerman, 2004**), sin embargo, en los 5 casos en que se utilizó macrólido (factor que puede alterar los resultados de las muestras a las que se inoculó cepa de referencia), el antibiótico se inicio después de la toma de muestras.

Con las 128 muestras analizadas (64 inoculadas con las cepas de referencia ATCC para *Mh* y *Uu* y 64 sin cepa) se determinó la validez y seguridad de cada una de las pruebas diagnósticas, a través de la construcción de tabla de contingencia, de elección para variables dicotómicas, se obtuvieron los siguientes resultados. Para fines prácticos, se eliminó la muestra de un paciente, que previamente estaba infectado por *Ureaplasma urealyticum*, determinándose valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos en 126 muestras (63 muestras con cepa de referencia y 63 muestras sin cepa de referencia), la eliminación de esta muestra de la cual se obtendría un control positivo y uno negativo, se realizó con la finalidad de evitar sesgo en los resultados.

Resultados con la prueba Mycofast Evolution 3 para la detección de *Mycoplasma hominis*:

Se inocularon 63 muestras de aspirado bronquial con cepa de referencia ATCC para Mh y se efectuó control negativo con otras 63 muestras a las cuales no se inoculó cepa de referencia, los resultados fueron los siguientes (tabla 9):

Tabla 9: Construcción del cuadro tetraecoico para la determinación de validez y seguridad de Mycofast Evolution 3, para detección de <i>Mycoplasma hominis</i>			
Resultado de la prueba	Muestra con Cepa de referencia Mh	Muestra sin cepa de referencia Mh	Total
Prueba +	61	1	62
Prueba -	2	62	64
Total	63	63	126

Como se aprecia en la tabla anterior, de 63 muestras de aspirado a las que no se inoculó cepa de referencia de Mh, en 62 el resultado fue negativo y en una muestra el resultado fue positivo, en este caso en particular, se presentó un cambio en la coloración de amarillo a rojo pese a la ausencia de cepas de referencia, se cultivo dicha muestra en Agar Mac Conkey, obteniéndose crecimiento de *Proteus mirabilis*, enterobacteria capaz de producir ureasa, enzima que cataliza la hidrólisis de urea a dióxido de carbono y amoníaco de acuerdo a la fórmula básica:



Posteriormente la muestra fue filtrada a través de una membrana de 0,45µm, y se repitió la prueba encontrándose resultado negativo por ausencia de cepa.

Por otro lado, con respecto a las 63 muestras en las que se inoculó cepa de referencia de Mh, se obtuvo resultado negativo por Mycofast en 2 muestras (coincidiendo con resultado negativo de caldo arginina pese a inoculación con cepas de referencia), y PCR con resultado positivo, esto puede ser secundario a falta de viabilidad de *Mycoplasma hominis*, ya que este microorganismo altamente sensible a factores ambientales a que se expone y cualquier alteración en la técnica de inoculación pudo condicionar la muerte de una gran cantidad de bacterias, lo que genera ausencia en el metabolismo de la arginina

(principio básico de Mycofast y caldo arginina), por lo tanto, se generó un resultado negativo, por ausencia de liberación de amoníaco al medio, sin embargo, PCR al amplificar segmentos de material genético, no requiere que la bacteria se encuentra viable para detectarla, por ello el resultado con esta fue positivo.

Tomando en cuenta las fórmulas para determinación de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN, se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 10):

Tabla 10: Resultado Sensibilidad, Especificidad, VPP y VPN de Mycofast Evolution 3 en muestras de aspirado bronquial para detección de <i>Mycoplasma hominis</i>			
Rubro	Resultado	Porcentaje	IC 95%
Sensibilidad	0,97	97%	0,92 - 1,01
Especificidad	0,98	98%	0,95 - 1,01
Valor predictivo positivo	0,98	98%	0,95 - 1,02
Valor predictivo negativo	0,97	97%	0,93 - 1,01
Cociente de probabilidad positivo	61	-----	8,72 - 426,77
Cociente de probabilidad negativo	0,03	-----	0,01 - 0,13

Los resultados de validez (S, E) y seguridad (VPP, VPN), y cocientes de probabilidad (razones de verosimilitud), así como cocientes de probabilidad de Mycofast Evolution 3 para la detección de *Mycoplasma hominis* fueron óptimas, con resultados por arriba de 95% con IC del 95%

Resultados con la prueba Mycofast Evolution 3 para la detección de *Ureaplasma urealyticum*:

En las 128 muestras analizadas (64 con cepa de referencia y 64 sin cepa de referencia) para la detección de *Ureaplasma urealyticum*, se observó lo siguiente: en 2 muestras a las cuales no se les administró cepa de referencia, se obtuvo resultado positivo por cambio de coloración en el medio, en 1 de

estas muestras, se obtuvo desarrollo de *Proteus mirabilis*, microorganismo capaz de producir ureasa y generar alcalinización del medio, induciendo resultado falso **positivo en Mycofast y en caldo urea**, pese a que esta muestra debió ser eliminada, se decidió filtrarla a través de una membrana de celulosa de 0,45 μ , y procesada nuevamente, sin *Colosacicepa*, obteniéndose resultado negativo, como es de esperarse.

En la otra muestra sin cepa en la que se obtuvo resultado positivo, se corroboró infección natural por *Ureaplasma urealyticum*, el paciente tuvo manifestaciones clínicas de neumonía y resultado positivo en los 3 métodos diagnósticos comparados en este protocolo: Mycofast Evolution 3, caldo urea y PCR, se inició tratamiento con claritromicina después de establecido el diagnóstico, por un período de 14 días. En este caso, y tomando en cuenta que el paciente ya estaba previamente infectado por bacteria atípica, se decidió eliminar esta muestra para evitar sesgo en los resultados, por lo que el cálculo se realizó tomando en cuenta sólo 126 muestras (eliminación de un control positivo y negativo de paciente previamente infectado por *U.U.*) (tabla 11)

Tabla 11: Construcción de cuadro tetraecoico para la determinación de validez y seguridad de Mycofast Evolution 3, para detección de <i>Ureaplasma urealyticum</i>			
Resultado de la prueba	Muestra con Cepa de referencia Mh	Muestra sin cepa de referencia Mh	Total
Prueba +	62	1	63
Prueba -	1	62	63
Total	63	63	126

En el caso de los pacientes a los que se tomó muestra de aspirado bronquial y se inoculó cepa de referencia ATCC de *Ureaplasma urealytum*, en 63 casos se obtuvo resultado positivo por Mycofast y en un caso, se obtuvo resultado negativo en Mycofast Evolution 3 y caldo urea, pero resultado positivo por PCR,

es importante tomar en cuenta, que tanto Mycofast como los medios de cultivo líquidos requieren bacterias vivas para que el metabolismo de las mismas, genere la alcalinización del medio, como la se expuso en otro apartado de este trabajo de tesis, sin embargo, la técnica de biología molecular PCR, no requiere que la bacteria se encuentre viva para obtener un resultado, ya que amplifica el genoma de la misma, en caso de estar presente, por lo que este resultado se cataloga como falso negativo. La explicación más aceptable de este resultado falso negativo, es una posible pérdida de viabilidad de *Ureaplasma* durante el proceso de inoculación y/o transporte de la muestra biológica.

Tomando en cuenta las fórmulas para determinación de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN, se obtuvieron los siguientes resultados (tabla 12):

Tabla 12: Resultado Sensibilidad, Especificidad, VPP y VPN de Mycofast Evolution 3 en muestras de aspirado bronquial para detección de <i>Ureaplasma urealyticum</i>			
Rubro	Resultado	Porcentaje	IC 95%
Sensibilidad	0,98	98%	0,95 - 1,01
Especificidad	0,98	98%	0,95 - 1,01
Valor predictivo positivo	0,98	98%	0,95 - 1,01
Valor predictivo negativo	0,98	98%	0,95 - 1,01
Cociente de probabilidad positivo	62	-----	8,87 – 433,45
Cociente de probabilidad negativo	0,02	-----	0,00 – 0,11

Resultados con caldo Urea para la detección de *Ureaplasma urealyticum*

En las 126 muestras analizadas (63 con cepa de referencia y 63 sin cepa de referencia), se encontraron los siguientes resultados al utilizar *caldo urea* como

método diagnóstico, que es un medio de cultivo líquido exclusivo para el crecimiento de *Ureaplasma urealyticum* (tabla 13):

Tabla 13: Construcción de cuadro tetraecoico para la determinación de validez y seguridad de Caldo Urea, para detección de <i>Ureaplasma urealyticum</i>			
Resultado de la prueba	Muestra con Cepa de referencia Mh	Muestra sin cepa de referencia Mh	Total
Prueba +	60	1	61
Prueba -	3	62	65
Total	63	63	126

Tomando en cuenta las fórmulas para determinación de sensibilidad, especificidad, VPP, VPN, CPP, CPN (IC del 95%) se obtuvieron los siguientes resultados (tabla 14):

Tabla 14: Resultado Sensibilidad, Especificidad, VPP y VPN de Caldo Urea en muestras de aspirado bronquial para detección de <i>Ureaplasma urealyticum</i>			
Rubro	Resultado	Porcentaje	IC 95%
Sensibilidad	0,95	95%	0,90 - 1,00
Especificidad	0,98	98%	0,95 - 1,01
Valor predictivo positivo	0,98	98%	0,95 - 1,02
Valor predictivo negativo	0,95	95%	0,90 - 1,00
Cociente de probabilidad positivo	60	-----	8,58 – 419,69
Cociente de probabilidad negativo	0,05	-----	0,02 – 0,15

Resultados con caldo Arginina para la detección de *Mycoplasma hominis*:

Se encontraron los siguientes resultados al utilizar *caldo arginina* como método diagnóstico, que es un medio de cultivo líquido exclusivo para el crecimiento y desarrollo de *Mycoplasma hominis* (tabla 15):

Tabla 15: Construcción del cuadro tetraecoico para la determinación de validez y seguridad de Caldo Arginina, para detección de <i>Mycoplasma hominis</i>			
Resultado de la prueba	Muestra con Cepa de referencia Mh	Muestra sin cepa de referencia Mh	Total

Prueba +	59	1	60
Prueba -	4	62	66
Total	63	63	126

Tomando en cuenta las fórmulas para determinación de sensibilidad, especificidad, VPP, VPN, CPP y CPN (IC del 95%) se obtuvieron los siguientes resultados (**tabla 16**):

Tabla 16: Resultado Sensibilidad, Especificidad, VPP y VPN de Caldo Arginina en muestras de aspirado bronquial para detección de <i>Mycoplasma hominis</i>			
Rubro	Resultado	Porcentaje	IC 95%
Sensibilidad	0,94	94%	0,88 - 1,00
Especificidad	0,98	98%	0,95 - 1,01
Valor predictivo positivo	0,98	98%	0,95 - 1,02
Valor predictivo negativo	0,94	94%	0,88 - 1,00
Cociente de probabilidad positivo	60	-----	8,43 – 412,81
Cociente de probabilidad negativo	0,05	-----	0,02 – 0,17

Resultados con PCR para la detección de *Mycoplasma hominis*:

Al utilizar la prueba de biología molecular PCR, se obtuvieron resultados verdaderos positivos en el 100% de las muestras con cepa, y verdaderos negativos en el 100% de las muestras sin cepa (tabla 17):

Tabla 17: Construcción del cuadro tetraecocio para la determinación de validez y seguridad de PCR, para detección de <i>Mycoplasma hominis</i>			
Resultado de la prueba	Muestra con Cepa de referencia Mh	Muestra sin cepa de referencia Mh	Total
Prueba +	63	0	63
Prueba -	0	63	63
Total	63	63	126

Tomando en cuenta las fórmulas para determinación de sensibilidad, especificidad, VPP, VPN, CPP y CPN, se obtuvieron los siguientes resultados (tabla 18):

Tabla 18: Resultado Sensibilidad, Especificidad, VPP y VPN de PCR en muestras de aspirado bronquial para detección de <i>Mycoplasma hominis</i>			
Rubro	Resultado	Porcentaje	IC 95%
Sensibilidad	1,00	100%	1,00- 1,00
Especificidad	1,00	100%	1,00- 1,00
Valor predictivo positivo	1,00	100%	1,00- 1,00
Valor predictivo negativo	1,00	100%	1,00- 1,00
Cociente de probabilidad positivo	Inf	-----	-----
Cociente de probabilidad negativo	0,00	-----	0,00- NaN

Resultados con PCR para la detección de *Ureaplasma urealyticum*:

Cuando se utilizó la prueba de biología molecular PCR para detectar material genético de *Mycoplasma hominis* en las muestras de aspirado bronquial con y sin cepa de referencia se obtuvieron los siguientes resultados (tabla 19):

Tabla 19: Construcción del cuadro tetraecocío para la determinación de validez y seguridad de PCR para detección de <i>Ureaplasma urealyticum</i>			
Resultado de la prueba	Muestra con Cepa de referencia Mh	Muestra sin cepa de referencia Mh	Total
Prueba +	62	0	62
Prueba -	1	63	64
Total	63	63	126

Con base a los resultados anteriores se obtuvieron los siguientes parámetros de validez y seguridad para PCR, que se muestran en la tabla 20:

Tabla 20: Resultado Sensibilidad, Especificidad, VPP y VPN de PCR en muestras de aspirado bronquial para detección de <i>Ureaplasma urealyticum</i>			
Rubro	Resultado	Porcentaje	IC 95%
Sensibilidad	0,98	98%	0,95- 1,01
Especificidad	1,00	100%	1,00- 1,00
Valor predictivo positivo	1,00	100%	1,00- 1,00
Valor predictivo negativo	0,98	98%	0,95- 1,01
Cociente de probabilidad positivo	Inf	-----	-----
Cociente de probabilidad negativo	0,02	-----	0,00- 0,11

Finalmente, al comparar los resultados de validez y seguridad de los 3 métodos diagnósticos analizados en este protocolo, se observa lo siguiente (tabla 21 y Gráfico IV):

Tabla 21: Comparativo de los resultados de validez y seguridad de cada una de las pruebas diagnósticas a analizadas en este protocolo de estudio												
Prueba	CU	IC 95%	CA	IC 95%	ME3 Uu	IC 95%	ME3 Mh	IC 95%	PCR Uu	IC 95%	PCR Mh	IC 95%
S	0,95	0,90 - 1,00	0,94	0,88- 1,00	0,98	0,95 - 1,01	0,97	0,92 - 1,01	0,98	0,95- 1,01	1,00	1,00- 1,00
E	0,98	0,95 - 1,01	0,98	0,95- 1,01	0,98	0,95 - 1,01	0,98	0,95 - 1,01	1,00	1,00- 1,00	1,00	1,00- 1,00
VPP	0,98	0,95 - 1,02	0,98	0,95- 1,02	0,98	0,95 - 1,01	0,98	0,95 - 1,02	1,00	1,00- 1,00	1,00	1,00- 1,00
VPN	0,95	0,90 - 1,00	0,94	0,88- 1,00	0,98	0,95 - 1,01	0,97	0,93 - 1,01	0,98	0,95- 1,01	1,00	1,00
CPP	60	8,58 - 419,69	59	8,43- 412,81	62	8,87 - 433,45	61	8,72 - 426,77	Inf	-----	Inf	-----
CPN	0,05	0,02 - 0,15	0,06	0,02- 0,17	0,02	0,00 - 0,11	0,03	0,01 - 0,13	0,02	0,0- 0,11	0,00	0,00- NaN

*S=Sensibilidad, E=Especificidad, VPP=Valor predictivo positivo, VPN=Valor predictivo negativo, CPP= Cociente de probabilidad positivo, CPN=Cociente de probabilidad negativo, CU=Caldo Urea, CA=Caldo arginina, PCR=Reacción en cadena de polimerasa, ME3=Mycofast Evolution 3, IC 95%=Intervalo de confianza del 95%, Uu=Ureaplasma urealyticum, Mh= Mycoplasma hominis.

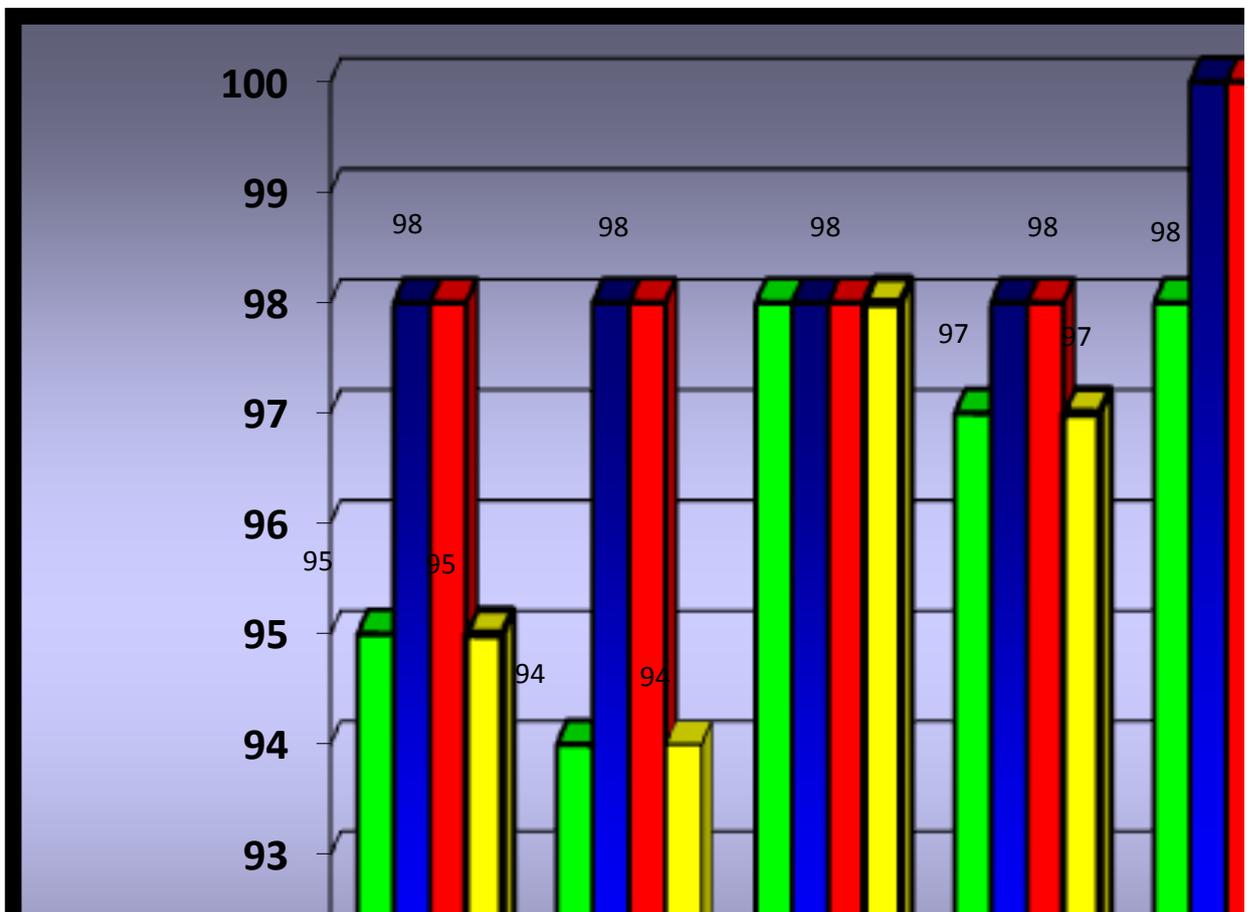


Gráfico IV: Comparación de los resultados de validez y seguridad de los 3 métodos diagnósticos evaluados en este protocolo.

DETERMINACION DE LA CONCORDANCIA

Se determinó una concordancia simple, tomando en cuenta los resultados verdaderos positivos y verdaderos negativos para cada una de las pruebas. La prueba de biología molecular PCR fue la que obtuvo mayor rendimiento con valores de validez y seguridad cercanos al 100%, superando al estándar de oro (caldos de cultivo), por esta razón, nuestra prueba piloto, objeto de este estudio, se comparó con la prueba de reacción en cadena de polimerasa para determinar la concordancia simple. También, la prueba considerada estándar de oro (caldos de cultivo), se compararon con la prueba de biología molecular.

CONCORDANCIA ENTRE PCR Y MYCOFAST EVOLUTION 3:

MYCOPLASMA HOMINIS:

Se tomaron en cuenta las muestras inoculadas con cepa de referencia de *M.h.* como verdaderos positivos, y la muestras no inoculadas como verdaderos negativos, y se obtuvieron los resultados mostrados en las tablas 22 y 23:

Tabla 22: Determinación de la concordancia existente entre PCR y Mycofast Evolution 3 para la detección de <i>Mycoplasma hominis</i> en muestras inoculadas (Verdaderos positivos)					
	PCR con referencia	detección cepa de	Mycofast detección cepa de referencia	E3 con	Concordancia
Resultado positivo		63		61	0,96 (96%)

Tabla 23: Determinación de la concordancia existente entre PCR y Mycofast Evolution 3 para la detección de ausencia de <i>Mycoplasma hominis</i> en muestras no inoculadas (Verdaderos negativos)					
	PCR sin referencia	detección cepa de	Mycofast detección de referencia	E3 sin cepa	Concordancia
Resultado negativo		63		63	1,00 (100%)

CONCORDANCIA ENTRE PCR Y CALDO ARGININA: MYCOPLASMA HOMINIS:

Se tomaron en cuenta las muestras inoculadas con cepa de referencia de *M.h.* como verdaderos positivos, y la muestras no inoculadas como verdaderos negativos, y se obtuvieron los resultados mostrados en las tablas 24 y 25:

Tabla 24: Determinación de la concordancia existente entre PCR y Caldo Arginina para la detección de <i>Mycoplasma hominis</i> en muestras inoculadas (Verdaderos positivos)					
	PCR con referencia	detección cepa de	Caldo detección cepa de referencia	Arginina con	Concordancia
Resultado positivo		63		59	0,93 (93%)

Tabla 25: Determinación de la concordancia existente entre PCR y Caldo arginina para la detección de ausencia de <i>Mycoplasma hominis</i> en muestras no inoculadas (Verdaderos negativos)					
	PCR	detección	Caldo	arginina	Concordancia

	sin cepa de referencia	detección sin cepa de referencia	
Resultado negativo	63	63	1,00 (100%)

CONCORDANCIA ENTRE PCR Y MYCOFAST EVOLUTION 3: UREAPLASMA UREALYTICUM:

Se tomaron en cuenta las muestras inoculadas con cepa de referencia de *U.u.* como verdaderos positivos, y la muestras no inoculadas como verdaderos negativos, y se obtuvieron los resultados mostrados en las tablas 26 y 27:

Tabla 26: Determinación de la concordancia existente entre PCR y Mycofast Evolution 3 para la detección de <i>Ureaplasma urealyticum</i> en muestras inoculadas (Verdaderos positivos)				
	PCR con referencia	detección cepa de	Mycofast E3 con referencia	Concordancia
Resultado positivo	62		62	1,00 (100%)

Tabla 27: Determinación de la concordancia existente entre PCR y Mycofast Evolution 3 para la detección de ausencia de <i>Ureaplasma urealyticum</i> en muestras no inoculadas (Verdaderos negativos)				
	PCR sin referencia	detección cepa de	Mycofast E3 sin referencia	Concordancia
Resultado negativo	63		62	0,98 (98%)

CONCORDANCIA ENTRE PCR Y CALDO UREA: UREAPLASMA UREALYTICUM:

Se tomaron en cuenta las muestras inoculadas con cepa de referencia de *U.u.* como verdaderos positivos, y la muestras no inoculadas como verdaderos negativos, y se obtuvieron los resultados mostrados en las tablas 28 y 29:

Tabla 28: Determinación de la concordancia existente entre PCR y Caldo Urea para la detección de <i>Ureaplasma urealyticum</i> en muestras inoculadas (Verdaderos positivos)				
	PCR con referencia	detección cepa de	Caldo Urea con referencia	Concordancia
Resultado positivo	62		60	0,96 (96%)

Tabla 29: Determinación de la concordancia existente entre PCR y Caldo Urea para la detección de ausencia de *Ureaplasma urealyticum* en muestras no inoculadas (Verdaderos negativos)

	PCR sin referencia	detección cepa de	Caldo detección de referencia	arginina sin cepa	Concordancia
Resultado negativo		63		62	0,98 (98%)

Se observaron en todos los casos concordancia superior al 95%, entre la prueba de biología molecular (mayor rendimiento diagnóstico), Mycofast Evolution 3 y los caldos de cultivo, tomando en cuenta que el protocolo se realizó bajo condiciones controladas, con inoculación de muestras con cepas bacterianas puras, sin embargo, si se tratase de probar el estudio en muestras biológicas de pacientes con posible enfermedad quizás los resultados variarían.

17.- DISCUSION

Los micoplasmas son bacterias que carecen de pared celular de peptidoglicanos, capaces de producir una amplia variedad de enfermedades clínicas en seres humanos de todos los grupos de edad. Uno de los grupos más vulnerables son los neonatos, ya que, debido a la inmadurez de su sistema inmunológico, son vulnerables a desarrollar enfermedades secundarias a la infección por estos agentes. Las tasas de colonización vaginal en las mujeres embarazadas en México son de aproximadamente 21%, y están en estrecha relación con la transmisión vertical de estos 2 agentes al neonato. En general, existe una gran dificultad en distinguir a la paciente colonizada con micoplasmas de la que no lo está, debido , entre otros factores a que, a menudo, las mujeres se encuentran asintomáticas, lo que aumenta el riesgo para el neonato, hijo de madre colonizada. La neumonía en el neonato, es una de las complicaciones más importantes de la infección por micoplasmas, a menudo el cuadro clínico es inespecífico, y se retarda el inicio del tratamiento antimicrobiano, lo cual conduce a un incremento en la mortalidad y morbilidad debida a la infección de vías respiratorias bajas por estos agentes. La identificación de estos microorganismos en el laboratorio presenta problemas debido a sus características microbiológicas particulares, y exigentes condiciones para su crecimiento. El uso de medios líquidos (caldos) para la detección de Micoplasmas, resulta costoso, y la disponibilidad en medios hospitalarios es reducida, además, otorga resultados en tiempo largo, habitualmente, mayor a 5 días. Las pruebas de biología molecular como Reacción en cadena de Polimerasa (PCR de las siglas en inglés) presentan una alta sensibilidad y especificidad para detección de agentes antimicrobianos superior al 95%, de acuerdo a lo reportado en la literatura, sin embargo, tiene la

gran virtud de otorgar resultados en horas, sin embargo su disponibilidad en medios hospitalarios en México también es limitada. En este protocolo, se utilizó el kit comercial Mycofast Evolution 3 ® para identificar *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis* en muestras de aspirado bronquial de neonatos. Este kit, consiste en una prueba de detección rápida, que se basa en el metabolismo de sustratos como urea (*Ureaplasma urealyticum*) y arginina (*Mycoplasma hominis*) a través de reacciones de hidrólisis, para condicionar la liberación de amoníaco al medio, lo cual genera alcalinización del mismo y cambio de coloración que indica un resultado positivo y refleja directamente viabilidad de las bacterias en el medio y metabolismo activo de las mismas. Este mismo principio básico se presenta en los caldos urea y arginina, que habitualmente se utilizan en el Instituto Nacional de Perinatología para el diagnóstico de infección por cualquiera de estos 2 agentes. El kit Mycofast fue diseñado para detectar *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* en diversas muestras biológicas como: secreción endocervical, vaginal, jugo gástrico, semen, esperma, orina, con resultados satisfactorios y con elevada concordancia (mayor a 97%) con los cultivos considerados estándar de oro: Agar A7. Este Kit no ha sido utilizado en muestras de aspirado bronquial, y consideramos que podría ser utilizado como herramienta diagnóstica alternativa en el diagnóstico de estos agentes, en aspirado bronquial, y la utilidad sería el poder diagnosticar de forma oportuna neumonía en neonatos sujetos a factores de riesgo. Si bien, la prevalencia reportada de Infección respiratoria baja por estos agentes, en neonatos en general es baja. En el INPer IER algunos estudios han reportado una prevalencia de hasta 9%, en neonatos prematuros extremos sujetos a ventilación mecánica. Debido a la dificultad de encontrar casos de infección natural por *Mycoplasma* y *Ureaplasma*, y tomando en cuenta que el objetivo medular de este protocolo de

estudio fue el valorar si el Kit Mycofast es útil para detectar a los microorganismos previamente mencionados, nosotros decidimos trabajar en condiciones controladas, tomando muestras de aspirado bronquial obtenidas por lavado broncoalveolar de pacientes orointubados de la Unidad de Cuidados Intensivos neonatales del Instituto de Nacional de Perinatología, ubicado en la Ciudad de México. Independientemente del diagnóstico del paciente, siempre y cuando no recibieran tratamiento con macrólidos o agentes antimicrobianos que inhibieran la síntesis de proteínas bacterianas, ya que este factor altera la viabilidad de las bacterias inoculadas impidiendo el principio básico de la prueba basado en metabolismo bacteriano. Se obtuvo muestra de aspirado, la cual, bajo condiciones controladas se fraccionó en 2 porciones, a una de las cuales se inoculó cepa de referencia para *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum*. El proceso consistió en adicionar cepas puras de M.h. y U.u. a la muestra de aspirado bronquial, diluyendo 50 µL de cada cepa, por cada 300 µL de aspirado bronquial, con lo cual se obtiene una concentración bacteriana de 10⁵ UFC/ml, la otra porción de la muestra no fue inoculada, de esta manera, de obtenía un control positivo y uno negativo de la misma muestra de aspirado bronquial, tomada con la misma técnica y al mismo instante, lo cual reduce el riesgo de sesgo de selección, ya que la muestra es tomada del mismo paciente, al mismo momento y bajo las mismas circunstancias. Se obtuvo muestra de aspirado en 64 pacientes, las cuales se fraccionaron en 2 porciones. La gran mayoría de pacientes objeto de estudio, fueron prematuros con edad gestacional comprendida entre 28 a 36 semanas (78,12%) de la población. La mayor parte de ellos, tuvieron diagnóstico principal de sepsis neonatal temprana y tardía, por ello, en 51 casos, existía antecedente de uso de antimicrobianos.

Se obtuvo un total de 128 muestras (64 inoculadas con cepa que corresponden a los verdaderos positivos y 64 sin cepa de referencia, correspondientes a los verdaderos negativos). Para fines prácticos, se eliminó la muestra de un paciente (un control positivo y negativo) debido a que previamente estaba infectado por *Ureaplasma urealyticum* y que detectamos durante la marcha del estudio. Esta eliminación se basa en el hecho de que, el incluir dicha muestra genera resultados positivos en la muestra de control negativo, lo que da lugar a un sesgo de selección, que aleja el resultado de la verdad, bajo condiciones controladas. Por lo que finalmente se determinaron valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos en 126 muestras (63 muestras con cepa de referencia y 63 muestras sin cepa de referencia).

Durante el análisis de resultados de Mycofast Evolution 3, para detectar *Mycoplasma hominis*, en 63 muestras a las que se inoculó cepa de referencia ATCC, en 2 se obtuvo un resultado negativo como se observa en las tablas anteriores, pese a inoculación de cepa, esto puede ser explicado por falta de viabilidad de los microorganismos inoculados, ya que debemos recordar que el principio básico de esta prueba en la detección de *Mycoplasma*, es el metabolismo de arginina, y para ello se requiere que las bacterias estén vivas, de otro modo, no se producirá el efecto deseado. En el caso de las muestras a las que no se inoculó cepa (control negativo), sólo se encontró un resultado falso positivo, debido a la contaminación de la muestra con *Proteus mirabilis*, agente que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, que es capaz de producir ureasa y metabolizar sustratos presentes en Mycofast induciendo un cambio en la coloración del medio por alcalinización, inclusive, esta muestra dio cambios de coloración en todo el panel (pozos destinados al crecimiento de *Ureaplasma*) y caldo urea/ arginina, por lo que tuvo que ser filtrada nuevamente a través de membrana de celulosa de 0,45µm. Varias enterobacterias pueden

inducir resultados falsos positivos en este tipo de pruebas, entre las que destacan *Serratia*, *Proteus*, *Klebsiella*, y bacterias de otro tipo como *H. pylori*, es por ello que como parte de la técnica se estandarizó filtrar la muestra antes de procesarla. Con la finalidad de que, bacterias mayores a $0,45\mu\text{m}$ quedasen retenidas, como es el caso de *Enterobacterias* que son el factor más comúnmente implicadas en resultados falsos positivos. Sin embargo los resultados de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo, se encontraron por arriba de 95%, si bien, las muestras biológicas se procesaron bajo condiciones controladas, ya que se llevó a cabo inoculación dirigida de cepas, el objetivo fundamental del estudio fue probar si este reactivo rápido, era capaz de detectar micoplasmas en aspirado bronquial. Con los resultados obtenidos, podemos establecer, que la prueba mide efectivamente lo que debe medir (validez de la prueba diagnóstica), es decir, es capaz de clasificar correctamente a la muestra que tiene cepa (verdadero positivo), de la muestra carente de la misma (verdadero negativo). Por otro lado, los parámetros de seguridad de la prueba diagnóstica (valores predictivos), tuvieron resultado por arriba del 95% para detección de *Mycoplasma hominis*, es decir: las pruebas con resultado positivo, tuvieron una adecuada correlación con las muestras que tenían cepa y las pruebas con resultado negativo, también tuvieron una buena correlación con las muestras que carecían de cepa. Si bien, en este caso, no se abordaron pacientes realmente enfermos, la tabla de contingencia se construyó con base en muestras con cepa, muestras sin cepa (analogía con pacientes enfermos) y resultado positivo y negativo de la prueba (variable dicotómica).

En este caso se anuló, la influencia de la prevalencia de la enfermedad, porque no se efectuó el estudio en pacientes con sospecha de enfermedad, sino en muestras controladas. Sin embargo, se decidió la determinación de cocientes

de probabilidad que miden cuanto más probable es que un resultado concreto (positivo o negativo) se relacione a la presencia o ausencia de enfermedad (en este caso, se relaciona un resultado positivo o negativo a la presencia o ausencia de cepa de referencia). En este caso, el cociente de probabilidad positivo de Mycofast para detectar *M. hominis* fue de 61, esto revela que es 61 veces más probable obtener un resultado positivo en la prueba cuando se trabaja muestra inoculada, que en el caso de trabajar una muestra no inoculada con este test, estableciéndose la relación entre sensibilidad y especificidad en un solo índice.

Con respecto a la evaluación de Mycofast para la detección de Ureaplasma, se obtuvo un resultado positivo en una muestra sin cepa de referencia, debido al mismo factor comentado en las líneas anteriores por contaminación de la misma con *Proteus mirabilis*, productor de ureasa que induce alcalinización del medio líquido de Mycofast y de caldos generando un resultado falso positivo, sin embargo, al igual que en el caso anterior, la muestra se sometió a proceso de filtración, y se efectuó nuevo control, en este caso en particular, al inicio del estudio se encontró una muestra perteneciente a un paciente que previamente ya estaba infectado por *Uu*, (neumonía), este caso fue descartado por generar un resultado positivo en una muestra control negativa (muestra que no fue inoculada), el dejar dicha muestra puede generar un sesgo de selección, debido que se estaría trabajando con grupos no comparables a causa de cómo se eligieron las muestras (ya que no es comparable una muestra que fue intencionadamente inoculada con cierta cantidad de inóculo a un paciente que presenta la infección natural). Pese a la eliminación de este par de muestras, también se obtuvieron resultados altamente satisfactorios de validez y seguridad, por arriba de 95%. Los resultados de validez y seguridad para caldo urea, caldo arginina y PCR también fueron satisfactorios. Sin embargo, de los 3

métodos diagnósticos analizados en este protocolo, la PCR fue el método que presento resultados más satisfactorios, de 98% a 100% (IC 95 1,00), para la detección de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum*, estos elevados valores que reflejan excelente seguridad y validez de la PCR, reflejan en parte la situación de que PCR no requiere metabolismo bacteriano activo, a diferencia de caldos y Mycofast, únicamente con mínima fracción de material genético, se puede efectuar amplificación del DNA bacteriano, detectando la presencia de las bacterias en las muestras analizadas.

Con respecto a la determinación de concordancia simple, se decidió hacer la comparación con la prueba de biología molecular PCR, debido a que fue el test que arrojó valores de validez y seguridad más elevados cercanos al 100% para detectar a los verdaderos positivos y verdaderos negativos. Al determinar la concordancia simple entre PCR y Mycofast Evolution 3 para detectar presencia de M. h. y U.u. encontramos que fue superior al 95% en todos los casos, si bien, la concordancia entre PCR y caldos urea(detección de U.U.) y caldo arginina (M.h.) fue más baja que entre PCR y ME3, también se obtuvieron resultados satisfactorios por arriba de 95%.

18.- CONCLUSIONES

1. Existe una concordancia fuerte de 96% entre PCR y Mycofast Evolution 3 para detectar *Mycoplasma hominis* en muestras inoculadas (verdaderos positivos)
2. Se obtuvo concordancia del 100% entre PCR y Mycofast Evolution 3 para detectar la ausencia de *Mycoplasma hominis* en muestras no inoculadas (verdaderos negativos)
3. Existe una concordancia de 100% entre PCR y Mycofast Evolution 3 para detectar *Ureaplasma urealyticum* en muestras inoculadas (verdaderos positivos) bajo condiciones controladas
4. Se obtuvo concordancia del 98% entre PCR y Mycofast Evolution 3 para detectar la ausencia de *Ureaplasma urealyticum* en muestras no inoculadas (verdaderos negativos)
5. La concordancia entre PCR y caldo arginina para detectar *Mycoplasma hominis* en muestra de aspirado bronquial inoculada con cepa de referencia (verdadero positivo) fue de 93%
6. La concordancia entre PCR y caldo arginina para detectar ausencia de *Mycoplasma hominis* en muestra de aspirado bronquial no inoculada con cepa de referencia (verdadero negativo) fue del 100%.
7. La concordancia entre PCR y caldo urea para detectar *Ureaplasma urealyticum* en muestra de aspirado bronquial inoculada con cepa de referencia (verdadero positivo) fue de 96%
8. La concordancia entre PCR y caldo urea para detectar *Ureaplasma urealyticum* en muestra de aspirado bronquial no inoculada con cepa de referencia (verdadero negativo) fue de 98%

9. Los resultados de sensibilidad y especificidad de Mycofast E3 para detección de *Mycoplasma hominis* fueron de 97% y 98%, respectivamente.
10. Los resultados de VPP y VPN de Mycofast E3 para detección de *Mycoplasma hominis* fueron de 98% y 97%, respectivamente.
11. Los resultados de sensibilidad y especificidad de Mycofast E3 para detección de *Ureaplasma urealyticum* fueron del 98%.
12. Los resultados de VPP y VPN de Mycofast E3 para detección de *Ureaplasma urealyticum* fueron del 98%.
13. Los resultados de sensibilidad y especificidad de caldo urea para detección de *Ureaplasma urealyticum* fueron del 95 y 98%, respectivamente.
14. Los resultados de VPP y VPN de Caldo urea para detección de *Ureaplasma urealyticum* fueron del 98 y 95%, respectivamente.
15. Los resultados de sensibilidad y especificidad de caldo arginina para detección de *Mycoplasma hominis* fueron del 94 y 98%, respectivamente.
16. Los resultados de VPP y VPN de Caldo arginina para detección de *Mycoplasma hominis* fueron del 98 y 94%, respectivamente.
17. Los resultados de sensibilidad y especificidad de PCR para detección de *Ureaplasma urealyticum* fueron del 98 y 100%, respectivamente.
18. Los resultados de VPP y VPN de PCR para detección de *Ureaplasma urealyticum* fueron del 100 y 98%, respectivamente.
19. Los resultados de sensibilidad y especificidad de PCR para detección de *Mycoplasma hominis* fue del 100%
20. Los resultados de VPP y VPN de PCR para detección de *Mycoplasma hominis* fue del 100%

21. Mycofast E3, detectó eficazmente ambas bacterias bajo condiciones controladas, en muestras de aspirado bronquial.
22. Los resultados de sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y positivo de Mycofast Evolution 3 fueron satisfactorios para ambas bacterias.
23. La prueba de biología molecular PCR fue la que obtuvo mayor seguridad, también bajo condiciones controladas
24. Los caldos urea y arginina ofrecieron los resultados más bajos de seguridad y validez en comparación con PCR y la prueba rápida aun en condiciones controladas.

19.- REFERENCIAS

-**Argimon JM**, Jiménez JJ. Métodos de investigación Clínica y Epidemiológica, 13ª Edición. 2006.

-**Barbul A.** Arginine: biochemistry, physiology, and therapeutic implications", JPEN J Parenter Enteral Nutr. 1986 Mar-Apr;10(2):227-38

-**Bartlett & Stirling** (2003)—A Short History of the Polymerase Chain Reaction. In: Methods Mol Biol. 226:3-6

-**Best y Taylor**, Bases Fisiológicas de la Práctica Médica, 12°. Edición, 1993.

-**Berne y Levy**. Fisiología, 3º edición, 2001.

-**Blanchard A.**, J. Duffy, K. Baldus and G.H. Casell. 1993. Detection of *Ureaplasma urealyticum* by PCR in the urogenital tract of adults, in amniotic fluid, and in the respiratory tract of newborns. Clin. Infect. Dis. 17(suppl.) S148-S153.

-**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.

-**Cassell GH**, Cole BC. 1981. Mycoplasmas as agents of human disease. New Engl. J. Med 304 : 80-89.

-**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.

-**Cerda LJ**, Villaroel DL. Evaluación de la concordancia interobservador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. Bioestadística. Rev Chil Pediatr 2008; 79 (1): 54-58

-**Cingolani**, Houssay y col. Fisiología Humana. 7º Ed., 2000.

-**Cortes J**, <http://www.joseacortes.com/galeriainmag/microorganismos/ureasa.jpg>, 2010. Consultado el 31/05/2011

-**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

-**Dahm R** (2005). «Friedrich Miescher and the discovery of DNA». *Dev Biol* 278 (2): pp. 274–88. doi:10.1016/j.ydbio.2004.11.028. PMID 15680349.

-**Dawson-Saunders, B.**; Trapp, R. G.: Basic & Clinical Biostatistics. Appleton & Lange. East Norwalk, Connecticut. 1994.

- 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.
- Epstein HF**. Intrauterin Infection and preterm Delivery. *New Engl. J. Med*, 2000; 342: 1500-07.
- Faro S**, Martens M, Maccato M, Hammil H, Pearlman M.: *Vaginal flora and pelvic inflammatory disease*. *Am J Obstet Gynecol*. 1993; 169: 470–473.
- Flannigan B**; Samson R; Miller JD. (editors) (2001). *Microorganisms in home and work environments. Diversity, health impacts, investigation and control*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam. ISBN 0-415-26800-1.
- Fletcher RH**, Fletcher SW. *Epidemiología Clínica*. 4a ed. Lippicott Williams & Wilkins, Barcelona. 2007; 39-63.
- 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.
- Gannong**. *Fisiología*. 18^o edición, 2001.
- Giron JA**, Lange M, Baseman J. 1996. Adherence, fibronectin binding and induction of cytoskeleton reorganization in culture human cells by *Mycoplasma penetrans*. *Infect. Immun* 65 : 197-208.
- 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.
- Guyton**- Hall *Tratado de Fisiología Médica*. 10^o edición, 2000.
- Henrich B**, Feldmann R, Hadding U. 1993. Cytoadhesins of *Mycoplasma hominis*. *Infect Immun* 61: 2945-2951.
- Hulley SB**, Cummings SV, Browner WS, Grady DG, Newman TB. *Diseño de Investigaciones Clínicas*. 3^a Edición. 2007.
- 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.
- Sambrook J**, Russel DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed. edición). Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- 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.
- Krause, D.C.** and Taylor-Robinson, D. 1992. Mycoplasmas which infect humans. In Maniloff, J., McElhaney, R.,C., Finch, L.R. and Baseman, J.B.

Mycoplasmas. Molecular biology and pathogenesis. American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA. pp. 417-444.

- **Laboratorio de Biología molecular.** Manual de procedimientos. INPer IER, actualización, 2011

-**Ortega J.U.** Determinación de *Mycoplasma* en Cultivo Celular. 2002. Tesis de Licenciatura. ENCB-IPN.

-**Mathews, C. K.,** Van Holde, K.E et Ahern, K.G. *Bioquímica* (3 edición). pp. 204 y ss, 2003.

-**Molinero LM.** Valoración de pruebas diagnósticas. En [www. seh-lilha.org/start1htm](http://www.seh-lilha.org/start1htm). Consultado el 29/07/2011

-**Morcillo J.** *Temas básicos de química* (2ª edición). Alhambra Universidad. 1989, p. 262-264. ISBN 9788420507828.

-**Olson LD,** Gilbert AA. 1993. Characteristics of *Mycoplasma hominis* adhesion. J Bacteriol 175: 3224-3227.

-**Ozdemir A,** Brown MA, Morgan WJ. Markers and mediators of inflammation in neonatal lung disease. *Pediatr Pulmonol* 1997; 23: 292-306.

-**Pereyre S,** Bebear CM, Bebear C. Les mycoplasmes en pathologie humaine. Revue Française des Laboratoires. Supplément au 2001 (329)34-36.

-**Pérez de Castro J.** Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR). Universidad Politécnica de Valencia, 2007. En <http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700>. Consultado 30/07/2011

-**Pita FS,** Pértegas DS. Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (España). Cad Aten Primaria 2003; 10: 120-124.

-**P.C. Choppa,** A. Vojdani, C. Tagle, R. Andrin and L. Magtoto.1998. Multiplex PCR for the detection of *Mycoplasma fermentans*, *M. hominis* and *M. penetrans*, in cell cultures and blood samples of patients with chronic fatigue syndrome. Mol. Cell. Probes. 12: 301-308.

- **Rada G.** Temas- Epidemiología analítica, 2007: <http://escuela.med.puc.cl/recursos/recepidem/EPIANAL9.HTM>. Consultado 29/07/2011.

-**Rappelli P,** Carta F, Delogu G, Filipp M, Dess D, Cappuceinelli P, Flori PL. 2001. *Mycoplasma hominis* and *Trichomonas vaginalis* symbiosis: multiplicity of infection and transmissibility of *M. hominis* to human cells. Arch Microbiol 175: 70-74

-**Razin S,** Yoguev D, and Naot Y. 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Microbiol Mol Biol Rev 162:1094-1156.

-**Razin S.** DNA probes and PCR diagnosis of *Mycoplasma* infections. Mol Cell. Probes 8: 497-511.

-**Razin S.** and Jacobs E. 1992. Mycoplasma adhesion. J Gen Microbiol. 1994; 138: 407-422.

-Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.

-**Remington J,** Klein J, Baker C, Wilson C. Infectious diseases of the fetus and the newborn infant. 2006: 6 ed. 1545-78.

-**Rhoades, R.A.** y Tanner G.A. Fisiología Médica, 1997.

-**Rubio RJ,** Cortés TF, Gaitán-Duarte H. Statistical methods for evaluating diagnostic test agreement and reproducibility. Rev. Col. Obs. & Gin. 2010; 3: 247-255.

-**Rudd, P.T.,** G.H.Cassell, K.B.Waites, J.K.Davis, and L.B. Duffy. Ureaplasma urealyticum pneumonia: experimental production and demonstration of age-related susceptibility. Infect. Immun. 1989: 57:918–925.

-**Ryan KJ,** Ray CG (editors) (2004). *Sherris Medical Microbiology* (4th ed. edición). McGraw Hill. pp. 409-12. ISBN 0838585299.

-**Sambrook J,** Russel DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed. edición). Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. ISBN 0-87969-576-5. Consultado 28/08/2011

-**Sen, C.K.** (2003) The general case for redox control of wound repair, *Wound Repair and Regeneration*, 11, 431-438.

-**Schimke RT,** Barile MF. Arginine metabolism in pleuropneumonia-like organisms isolated from mammalian cell culture. J Bacteriol. 1963. Aug; 86: 195-206.

-**Solis R,** Vázquez T. Susceptibilidad de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* ante diferentes antibióticos. Revista Médica de la universidad Veracruzana, 2006. Jul: 6: 2.

-**Spehr M,** Gisselmann G, Poplawsky A, Riffell JA, Wetzel CH, Zimmer RK, Hatt H. Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis. Science 2003; 299: 2054-2058.

-**Taylor-Robinson D.** 1995. *Mycoplasma* and *Ureaplasma*. In Manual of Clinical Microbiology. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, (Eds). 6a ed. ASM Press. Washintong D.C. pp. 652-662.

-**Taylor-Robinson D.** Infections due to species of *Mycoplasma* and *Ureaplasma*: an update. Clin Infect Dis 1996; 23: 671-684.

-**Towbin H,** Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Biochemistry 1979; 79:4350-4354.

-**Tully JG**. Current status of the *Mollicutes* flora of humans. *Clin Infect Dis* 1993; 17(Suppl. 1): S2-S9.

-**Tresguerres, J. A. F.**, Fisiología Humana, 2º. Edición, 1999

-**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.

-**Universidad Simón Bolívar**. Infecciones asociadas a Infertilidad.2000 <http://www.sogvzla.org/FTPSOGV/online/XXI%20Congreso%20Nacional/H.%20Infeccionesasociadasainfertilidad.doc>. Consultado 29/04/2011

-**Viscardi R**. Ureaplasma Species: Role in Diseases of Prematurity. *Clin Perinatol* 2010; 37: 392-409.

-**Waite K.B.**, M. Bebear, J. A. Robertson, D.F. Talkington and G.E. Kenny. In *Cumitech 34. Laboratory Diagnostic of Mycoplasma infections*. Coordinating Editorial F.S.Norte American Society for Microbiology Washington D.C. 2000; pp 1-30.

- **Watson, J, D.**; Baker, T. A.; Bell, S. P.; Gann, A.; Levine, M. et Losick, R. *Molecular Biology of the Gene* (Fifth edition edición). San Francisco: Benjamin Cummings, 2004

-**Wescor**. Mycofast EE.UU. urogenital Mycoplasma diagnóstico del Discovery, el distribuidor canadiense de Wescor del Mycofast EE.UU.

-**Zhan Q**, Wise KS. Molecular basis of size and antigenic variation of *Mycoplasma hominis* adhesin encoded by divergent *vaa* genes. *Infect. Immun*, 1996; 64: 2737-2744.

-**Xu C**, Sun GF, Zhu YF. The correlation of *Ureaplasma urealyticum* infection with infertility. *Andrologia*, 1997; 29:219-226.

-**Zuckerman JM**, Macrolides and ketolides: azithromycin, clarithromycin, telithromycin. *Infect Dis Clin N Am*, 2004; 18: 621- 649.

20.- ANEXOS



Anexo 1 CONSENTIMIENTO INFORMADO

En el margen de la Constitución Nacional y de la Ley , Yo Nombre:

Apellido: Edad: C.I. Natural de:

domiciliado en:

En calidad de madre o representante del niño:

Edad: Nacido en: Hago constar que he recibido información y he

entendido los siguientes aspectos derivados de la condición de enfermedad de mi hijo o representado:

1. He sido informada/o de que mi hijo o representado requiere ingresar a la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales por requerir monitoreo especial de sus funciones vitales o no estar en condiciones de mantenerlas por sí mismo
2. He sido informada/o de el/ los diagnóstico(s) presuntivo (s) que maneja el cuerpo médico, entiendo que en su calidad de presuntivo dicho diagnóstico no es definitivo y está sujeto a cambio.
3. He sido informada/o completamente de la necesidad de realizar algunos procedimientos invasivos y exámenes complementarios para llegar al diagnóstico definitivo e instaurar el tratamiento adecuado, para ello he dado mi consentimiento.
4. Me ha sido explicado de manera satisfactoria y en lenguaje comprensible la información referente a la historia natural de la enfermedad correspondiente al diagnóstico presuntivo, así como sus posibles complicaciones.
5. De igual modo he sido informada/o de la conducta terapéutica planteada por el equipo médico, me han sido explicados los beneficios pero también los posibles efectos indeseables o la falla de la misma, los cuales acepto y autorizo su aplicación.
6. Estoy en conocimiento que durante el transcurso de la evolución de la enfermedad pueden presentarse en mi hijo/representado condiciones imprevistas que puedan llegar a exigir procedimientos distintos o adicionales a los antes expuestos o a suspender el soporte vital por innecesario.
7. Declaro que el equipo médico se compromete a dar una buena práctica profesional y mantenerme informada/o de los acontecimientos.
8. Este formato es general, procedimientos específicos o cirugía pueden requerir información particular y detallada al caso.
9. Declaro que he formulado todas las preguntas que consideré necesarias sobre todos los aspectos antes mencionados y estoy satisfecha/o con las respuestas obtenidas.
10. He leído y entendido el formulario del consentimiento informado, por medio de mi firma declaro estar en total acuerdo con los aspectos contenidos en el mismo.

Firma de la madre / representante:

C.I.

Firma de testigo:

C.I.

Firma del Médico:

C.I.

Manifiesto no saber leer y escribir o estar en incapacidad de hacerlo por lo cual se me leyó el formulario de consentimiento informado, el cual entendí satisfactoriamente. Por medio de mi impresión dactilar declaro estar en total acuerdo con los aspectos contenidos en el mismo.

Nombre de la madre / representante:

C.I.

Huella dactilar, especifique dedo:

Fecha:

Anexo 2

HOJA DE CAPTACION DE DATOS

I.- FICHA DE IDENTIFICACIÓN:

Nombre del paciente:

Fecha:

Registro: Edad:

Fecha de nacimiento:

Sexo:

Semanas de edad Gestacional:

II.- HISTORIA PERSONAL:

1. Patología neonatal
2. Patología infecciosa
3. Uso previo de antimicrobianos

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. Cultivos.
4. PCR