

114

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA**

"Colonización por *Ureaplasma urelyticum* en aspirado traqueal de recién nacidos prematuros por cultivo y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)".

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

OTHON ROJAS MONTES

ASESOR Y DIRECTOR DE TESIS: DR. FELIPE GONZALEZ VELAZQUEZ

289891

LOS REYES IZTACALA

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

"Colonización por *Ureaplasma urelyticum* en aspirado traqueal de recién nacidos prematuros por cultivo y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)".

AGRADECIMIENTOS

A MI ASESOR:

DR. Felipe González Velázquez por ofrecerme esta tesis y brindarme su amistad, apoyo y conocimientos sobre los ureaplasmas.

Al jurado por su atención prestada y sus consejos invaluable:

Q.F.B: Gloria Luz Paniagua Contreras

M. C: Elías Piedra Ibarra

Biol. Irma Dueñas García

M.C: Eric Monroy Pérez

A todo el personal del laboratorio de Bacteriología de la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias (UIMEIP) del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMN SXXI) y de la Unidad de Investigación Médica en Infectología e Inmunología (UIMII) del Centro Médico Nacional La Raza (CMNR) IMSS por brindarme su amistad y apoyo incondicional.

El presente trabajo fue apoyado por la Fundación Mexicana Para la Salud (FUNSALUD) y realizado en el laboratorio de Bacteriología de la UIMEIP del Hospital de Pediatría (CMN SXXI) y en la UIMII del Hospital de Infectología (CMNR) del IMSS.

A MIS PADRES:

Por el cariño, paciencia, apoyo moral y económico que me han otorgado a lo largo de mi carrera.

A mis compañeros:

Jorge Humberto, Adrián Bautista Rivas, Josefina Cruz Santos, Alfonso Cabrera Zaragoza, por el apoyo incondicional a lo largo de la carrera.

INDICE

I	RESUMEN	1
II	INTRODUCCION	3
III	ANTECEDENTES	5
IV	GENERALIDADES	7
1.-	TAXONOMIA	7
	A) Clasificación	7
2.-	DESCRIPCION	8
	A) Características Microbiológicas y Morfológicas	8
3.-	MECANISMOS DE PATOGENICIDAD	11
4.-	EPIDEMIOLOGIA	12
	A) Mortalidad y morbilidad	15
	B) Colonización en Adultos	15
	C) Colonización Materna	16
	• Colonización en el tracto genital superior	
	D) Transmisión de la Madre al Recién Nacido	17
5.-	CARACTERISTICAS CLINICAS	18
	A) Infecciones en vías urinarias	19
	a) Uretritis No Gonocócica (UNG)	
	b) Prostatitis y Epididimitis	
	B) Otros Aspectos	20
6.-	FACTORES QUE FAVORECEN LA COLONIZACIÓN EN EL RECIEN NACIDO	21
	A) Prematurez	21
	B) Bajo Peso	21
	C) Vaginosis bacteriana	22
7.-	ENFERMEDADES QUE CAUSA EN EL RECIEN NACIDO	23
	A) Neumonía	23
	B) Meningitis	25

	C) Enfermedad Pulmonar Crónica (EPC) O Displasia Broncopulmonar (DBP)	26
	D) Sepsis neonatal	29
	E) Hipertensión Pulmonar Persistente (HPP)	30
8.-	SUSCEPTIBILIDAD Y RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS	30
9.-	DIAGNOSTICO	31
	A) Cultivos	31
	• Medio Stuart	
	• Medio 10B	
	• Medio Agar en Placa A8	
	B) Serología	32
	C) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	35
	• Fundamento	
	• DNA Blanco	
	• Enzima DNA Taq Polímerasa	
	• Magnesio y DNTPS	
	• DNA Ladder 123 bp	
	• Ciclos	
	• Temperatura de Alineamiento	
	• Problemas de Contaminación	
	• Progresos	
	D) TRATAMIENTO	40
	• Justificación	
	• Hipótesis	
	• Objetivo General	
	• Objetivos Particulares	
IV	METODOLOGIA	43
	A) Diseño Experimental	43
	B) Población	43
	C) Tipo de Muestra	43

D) Criterios de Inclusión	43
E) Criterios de Exclusión	43
F) Variables:	44
a) Independiente	
b) Dependiente	
G) Población de Estudio	44
H) Colecta de Muestras Clínicas	44
I) Transporte de las Muestras	45
J) Procesamiento de las Muestras en Cultivos	45
a) Medio Stuart	
b) Medio en Caldo 10B y Agar en placa A8	
K) Procesamiento de Muestra para la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	48
a) Extracción del DNA	
b) Mezcla Maestra	
L) Corrimiento de los Productos de PCR en Agarosa al 2%	49
a) Preparación de los Productos de PCR	
M) PCR con controles Internos	50
N) Purificación del DNA	50
Ñ) Diagramas de Flujo	52
V RESULTADOS	54
VI DISCUSION	63
VII CONCLUSIONES	69
VIII APENDICE	71
IX BIBLIOGRAFIA	85

RESUMEN

Ureaplasma urealyticum es un agente comensal del tracto genital en mujeres sexualmente activas, con una colonización del 40 al 80%; por lo que la transmisión es mayor de la madre hacia el hijo en el útero durante el nacimiento; se ha reportado en un 15% de colonización de los aspirados traqueales de recién nacidos prematuros, incrementándose las enfermedades respiratorias.

Actualmente se ha sugerido el papel patogénico de estos organismos y muy pocos laboratorios han hecho intentos por aislarlos dada su dificultad de identificación y a los requerimientos especiales en el medio de transporte y de cultivos para su crecimiento. En este trabajo se plantéo aislar e identificar a *U. urealyticum*.

Durante el período de septiembre de 1997 a septiembre de 1998 se colectaron 72 muestras de aspirados traqueales de recién nacidos prematuros, con edades de 1 a 7 días de haber nacido, con peso al nacimiento ≥ 550 y < 12 horas de intubación y de 63 recién nacidos a término y de 78 lactantes ambos fueron muestras de aspirados bronquiales. Las muestras de los aspirados traqueales colectadas a las 0, 24, 48, 72 hrs. y décimo día se inocularon en caldo 10B y agar A8, ambos se incubaron a 37 °C, las placas de agar A8 se incubaron en condiciones de anaerobiosis, los cultivos fueron revisados visualmente después de las 24, 48, 72 horas hasta 15 días de haberse cultivado.

De las 72 muestras clínicas de recién nacidos pretérmino, se identificaron 6 (8.33%) cepas de *U. urealyticum* por cultivo y 7(9.7%) por PCR, 9 cepas de otros microorganismos, como *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans*, *Pseudomona aeruginosa* y *Acinetobacter sp.*, en el caso de los recién nacidos a término se aislaron 10(15.9%) cepas de *U. urealyticum* por cultivo y PCR y 14 cepas de otros microorganismos como *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans*, *Acinetobacter sp.*, *Candida sp.* y *Klebsiella sp.*; de los 78 lactantes sólo se aislaron 3 cepas de *U. urealyticum* por cultivo y PCR y 12 cepas de otros microorganismos como *Staphylococcus epidermidis*,

***Streptococcus viridans*, *Pseudomona aeruginosa*, *Acinetobacter sp*,
Candida sp, *Klebsiella sp* y *Enterobacter cloacae*.**

U. urealyticum se aisló con mayor frecuencia en el primer día de vida en los recién nacidos prematuros (5.5%) con peso menor a 1200 g (9.7%) y 14.2% en los primeros 12 días de edad en los recién nacidos a término con peso menor a 3900 g (15.8%) y un 2.5% en los primeros siete meses de edad en los niños lactantes, con peso menor a 4300 g.

I INTRODUCCION

Los ureaplasmas son bacterias pleomórficas, parecen tener predilección importante por las células mesoteliales como pleura, peritoneo y cápsula sinovial de las articulaciones, por consiguiente afectan a los aparatos genital urinario y respiratorio.⁽¹⁾

Ureaplasma urealyticum es considerado como un agente comensal en mujeres con actividad sexual presentando una colonización en el tracto genital entre el 40% al 80% ⁽²⁾. En otros estudios se menciona un 38% a 94% en mujeres de bajo nivel socioeconómico.⁽³⁾

Suele encontrarse como flora normal en la vagina durante el embarazo; y se piensa que es un microorganismo oportunista y que su acción patógena se presenta al combinarse con otros microorganismos, o tal vez, al aumentar el número de organismos en presencia de ciertos factores predisponentes del huésped.^(4, 6) Es causa de uretritis no gonocócica (la proporción causada por ureaplasmas se desconoce); uretro prostatitis (la enfermedad puede ser aguda, pero no existen evidencias de que se produzca o sea crónica); epididimitis (se ha descrito un caso por ureaplasma); cálculos urinarios (se ha experimentado en ratas machos, pero se han reportado que los ureaplasmas producen cálculos vesicales y están aumentando las evidencias como una enfermedad en humanos); corioamnionitis, morbilidad perinatal, parto prematuro, aborto, muerte fetal, bajo peso al nacer, septicemia, meningitis y neumonía congénita. Existen también evidencias de que juega un papel importante en condiciones de infertilidad en pacientes adultos de ambos sexos aunque existen controversias por lo que no se ha determinado esta causalidad o asociación.^(1, 3, 5) La frecuencia de transmisión es mayor de la madre hacia el hijo en el útero durante el nacimiento, por lo que el aborto de algunas mujeres se asocia con infecciones en el cérvix por *Ureaplasma urealyticum* pudiendo desarrollar enfermedades respiratorias en el recién nacido. La colonización en el tracto respiratorio de algunos infantes prematuros está

asociada con varias enfermedades como neumonía, hipertensión pulmonar persistente, infecciones crónicas en el sistema nervioso central, y displasia broncopulmonar (DBP).

Actualmente muchos investigadores han sugerido el papel patogénico de *U. urealyticum*, y muy pocos laboratorios han hecho intentos para aislar éste microorganismo dada su dificultad de identificación debido a sus requerimientos especiales tanto en el medio de transporte como en el medio de cultivo para su crecimiento.⁽⁵³⁾ Es por ello que la mayoría de los autores sugieren que para el aislamiento e identificación del microorganismo se utilice una combinación de medio líquido con enriquecimiento.⁽⁷⁾ Sin embargo se debe considerar una serie de factores como la dificultad en su elaboración, su reproducibilidad y las ventajas de la relación costo beneficio.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un método de diagnóstico para muchas enfermedades infecciosas; particularmente causadas por estos microorganismos que son de cultivo difícil,^(97, 98) existen pocos reportes en la detección de *U. urealyticum* por PCR usando primers del antígeno multibandeado (AgMB). Con estas bases se eligió el medio en caldo 10B, agar A8 y la técnica de PCR para un diagnóstico rápido, sensible y específico.

Considerando que existen muy pocos estudios en México en los que se haya determinado la colonización de *U. urealyticum* de aspirados traqueales y bronquiales de recién nacidos prematuros, se decidió llevar a cabo este estudio.

II ANTECEDENTES

La investigación de los Mycoplasmas se inició en 1937 por Dienes y Edsall quienes identificaron un micoplasma como agente etiológico de un absceso de la glándula de Bartholin, siendo este el primer informe que se conoce de enfermedad en humano. Sin embargo, Eaton y colaboradores (1944) aislaron por vez primera a partir de embrión de pollo un *Mycoplasma pneumoniae*, la muestra provenía de un paciente con neumonía atípica primaria.⁽¹⁾

Gracias a estos estudios se empezaron a realizar las primeras investigaciones relacionando a los Mycoplasmas con enfermedades en humanos en los años cincuenta, al aislar las primeras colonias de paciente con uretritis no gonocócica recurrente,⁽⁸⁾ en abril de 1950 el Dr. Loéis Dienes, investigó la ruta de transmisión de Mycoplasmas en uretritis no gonocócica (UNG), en septiembre del mismo año en el laboratorio de Durham se preparó el agar conocido como "Agar sangre ascitis hervido" descrito por Klienberg y modificado por Dienes, la reacción del agar se ajustó a un pH de 7.8 a 8.0 y el 22 de septiembre se observaron las primeras colonias de *U. urealyticum* de formas diminutas 0/10, 0/12, 0/8 y 0/6 μ , aisladas de pacientes con uretritis no gonocócica el intervalo de su tamaño se observó de 7 a 20 μ m de diámetro; las colonias fueron llamadas como colonias "tiny" PPLO o cepa "T" de micoplasma; esta cepa se llama así por el tamaño pequeño de la colonia de Mycoplasmas que se desarrollan en el agar. En noviembre de 1950 la cepa de ureaplasma se aisló por vez primera en un paciente con síndrome de Reiter; en 1951 se realizó un simposium sobre enfermedades venéreas en Ronoke, por la Dra. Justina Hill; donde se habló sobre microorganismos parecidos a las que producían pleuroneumonía en bovinos (PPLO) y la relación con las enfermedades transmitidas sexualmente; aunque no se conocía la causa de la infección ni como se transmitía.⁽⁹⁾ Más tarde en 1952 se suprimió la sangre hervida en el agar para obtener aislamientos definidos y para la identificación de las colonias con mayor facilidad en cultivos de exudados uretrales

y sedimento urinario; y en 1954 fueron descritas por vez primera en dos fotomicrografías.^(9, 10) Estas bacterias se les consideró virus hasta 1960.⁽¹¹⁾

Se ha reportado que *U. urealyticum* crece más rápidamente en medio líquido, obteniéndose títulos máximos en 16 horas de incubación pero exceden raramente a 10^6 UFC/ml.⁽¹⁰⁾

En mayo de 1963 se describe que los ureaplasmas son capaces de hidrolizar la urea, y en 1969 se describió el agar diferencial con urea que daba un color semejante al obtenido por la prueba de ureasa incorporando un indicador de pH al principio bioquímico siendo el mismo de la fórmula para el agar estándar A5H.⁽⁹⁾ En 1970 fue descrito el primer medio de caldo de urea llamado U9; el cual se suplementó con 5% de suero de caballo, y como indicador se utilizaba el rojo de fenol para detectar la hidrólisis de la urea en relación con la producción de amonio con un rango de pH de 8 a 9 indicando el cambio de color amarillo a rojo.⁽¹¹⁾ Más tarde Kenng y Cartwright, confirmaron que la urea es una sustancia esencial para el crecimiento de ureaplasma, gracias a esta propiedad se pudo definir a los ureaplasmas dentro de la taxonomía para clasificarlos dentro del orden Mycoplasmataceae de la clase Mollicutes propuesto en 1974 por Shepard y cols.⁽¹⁰⁾ la cual clasificó a *U. urealyticum* como una especie para humanos.^(1, 9) En 1976, se formuló el agar diferencial A7, el cual contiene además el ion manganeso, dando la formación de un óxido metálico complejo en la superficie de las colonias de los Ureaplasma dándoles un color café y facilitando su observación a microscopía invertida.⁽⁹⁾ En 1978 se desarrolló el caldo 10B, utilizando el rojo de fenol como indicador y la urea como sustrato de la enzima, en este medio se observó que las cepas de *U. urealyticum* permanecían viables a -60°C y -70°C por largos períodos; y en 1983 se describió la fórmula del agar diferencial A8 empleándose al cloruro de calcio como indicador al oxidar CaCl^+ originando el color de las colonias.⁽¹²⁾

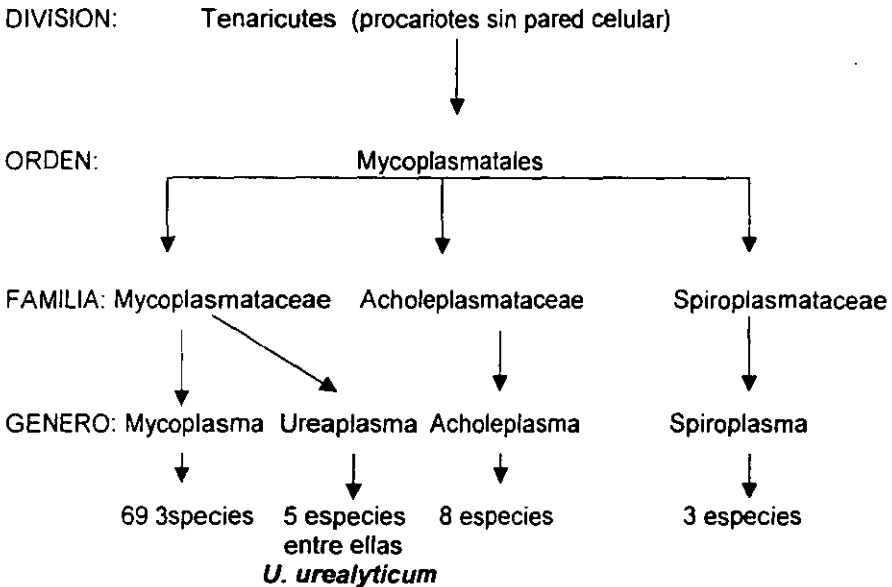
III GENERALIDADES

1 TAXONOMIA

A) CLASIFICACION

Los ureaplasmas pertenecen al orden Mycoplasmatales y a la familia Mycoplasmataceae, sólo se han descrito 5 especies de *U. urealyticum* (figura 1).

Figura 1 clasificación de *U. urealyticum*. (Shepard 1974, tomado de Gonzalez Sosa E.I).⁽¹⁰⁾



Por su contenido de ureasa les capacita para hidrolizar la urea con la consiguiente producción de amonio, *U. urealyticum* se encuentra separado de los demás miembros del orden de micoplasmatales.⁽¹¹⁾

Por análisis filogenético Wore y cols, concluyeron que los Mycoplasmatales son descendientes de un *Clostridium* ancestral. Las evidencias que apoyan esta hipótesis se ponen de manifiesto con datos obtenidos al analizar las secuencias

de RNA de los primeros y compararlos con estas bacterias Gram positivas; dentro de su homología posee un genoma de 500 microdaltones, cuentan con un contenido extremadamente bajo de pares de bases guanina-citosina (G-C), aproximadamente entre el 23 - 40 mol. %. Esto impone considerables restricciones en la capacidad de codificación y su explicación al bajo número de proteínas celulares.⁽¹⁾

2) DESCRIPCION

A) CARACTERISTICAS MICROBIOLOGICAS Y MORFOLOGICAS

Presentan las siguientes características: No tienen pared celular, pueden cultivarse en medios libres de células; requieren de colesterol para su desarrollo; el crecimiento, y el metabolismo o ambos es inhibido por anticuerpos específicos; son susceptibles a antimicrobianos que afectan a la síntesis de proteínas y son resistentes, a los que actúan a nivel de formación de pared celular, ya que carecen de esta estructura, son incapaces de sintetizar peptidoglicanos o sus precursores.

Están limitados por una membrana plásmatica de 75 a 100 Å de espesor, por lo que son altamente pleomórficos variando de forma esférica, piriforme o formas filamentosas o helicoidales. Esta triple membrana está compuesta por proteínas, glucolípidos y colesterol, su integridad se mantiene gracias a la presencia de iones magnesio.

Presentan una gran sensibilidad a las condiciones del medio (pH, temperatura, presión osmótica, luz ultravioleta y tensoactivos), es decir son gérmenes muy frágiles, son resistentes a antibióticos betalactámicos.

La ausencia de pared celular los hace muy susceptibles a lisis por choque osmótico, a detergentes y alcoholes. Por su estructura los mycoplasmatales pueden confundirse con formas L, protoplastos y esferoplastos, ya que esas variantes bacterianas también carecen de pared celular, la remoción de la pared en esas estructuras se pueden llevar a cabo por medio de hidrólisis de la célula

bacteriana con lisozima o por bloqueo de la biosíntesis de peptidoglicanos con antibióticos como la penicilina.

Los componentes intracelulares de los mycoplasmatales están constituidos por ribosomas y filamentos nucleares (ADN y ARN), se reproducen mediante la formación de un tabique bien definido con la integración de unidades reproductoras de cerca de 0.3 nm, aunque en realidad es difícil establecer sus dimensiones debido a su plasticidad; algunos de ellos pueden atravesar filtros con poro de 450nm.

Es probable que estas pequeñas unidades se conformen a partir de células de mayor tamaño de la que después se apartan semejando una gemación. La integración de los septos aparentemente sería regulada por mesosomas, ausentes en micoplasmatales, la cual les da un ciclo reproductivo particular.⁽¹⁾

El organismo es redondo, ovoide de aproximadamente de 350 nm de diámetro con oscilaciones entre 100 y 850 nm; también se observan estructuras bacilares y filamentosas con longitud de 24 μm y anchura entre 50 y 300 nm. En el material clínico a menudo se observan formas bacilares cortas con extremos punteados.

En cultivos jóvenes, de concentrados y teñidos por el método de Shepard de hematoxilina-Giemsa, los ureplasma pueden estar solos, en pares, triadas, pequeños acúmulos y/o en cadenas cortas de 3-5 elementos.⁽¹³⁾ A microscopía electrónica, se observan formas cocoides filamentosas y en rosario. Estos a su vez aparecen rodeados por una membrana única, trilaminar, de un grosor aproximado de 10 nm con estructuras que se proyectan desde la superficie.

Para el aislamiento e identificación del microorganismo se emplea un reactivo llamado "prueba rápida de ureasa" el cual se utiliza 0.1 M de urea y como indicador sensible al amonio el cloruro de calcio. Con esta prueba se puede detectar la actividad de la enzima ureasa que reacciona con la urea, produciendo amonio, que al degradar la urea se detecta un precipitado café sobre la colonia que es fácilmente observable a microscopía de bajo poder.⁽¹⁴⁾

En agar taponado para Mycoplasmas a pH de 6.0 las colonias de *U. urealyticum* son pequeñas de 20 a 30 μm de diámetro y varía de 7 a 15 μm de

diámetro y circulares con bordes irregulares crecen en sentido interior en el seno del agar; como se muestra en la figura 2.



Figura 2 Colonia de color oscuro característico de *U. urealyticum* (indicado con la flecha derecha) y *Mycoplasma hominis* Izquierda (tomado de Delgado I. Alberto 1994).⁽⁸³⁾

Una de las características del desarrollo de *Ureaplasma* en el medio líquido es la ausencia de turbidez y sedimento, solo debe observarse el vire del indicador que tiene el medio "rojo de fenol" de amarillo a rojo ámbar, que indica la alcalinidad originada por la producción de amonio, por el resultante incremento de pH en el medio.^(14, 15) Un crecimiento rápido de *Ureaplasma* se ha observado en 16 horas de incubación, por lo regular su desarrollo es de 18 a 24 horas o hasta los 7 días de incubación.

En un estudio realizado en 1992 se menciona que los cultivos en agar en placa con antibiótico deben incubarse a 37 °C con 5% de CO₂ y 95% de N₂.⁽¹¹⁾ Aún cuando el uso de incubadoras de CO₂ no suele recomendarse para pruebas estandarizadas de susceptibilidad,⁽¹⁶⁾ los *Ureaplasmas* son lo suficientemente capnófilicos que el incremento y obtención de un tamaño adecuado de colonias en agar justifica el uso de CO₂ para los aislados clínicos de bases reducidos.⁽¹²⁾ Ciertos aditivos en agar A8, como CaCl₂, son necesarios para la visualización adecuada de los microorganismos.⁽¹¹⁾

Un rasgo diferencial de las colonias de *U. urealyticum* respecto a los otros *Mycoplasmas* es la forma típica redonda pleomórficas de color pardo oscuro

debido a que crecen totalmente dentro del agar y a su pleomorfismo pueden estar agrupadas en cadenas o en pares y suelen confundirse con artefactos del medio. Otra forma para identificar las colonias de *Ureaplasma* de otros *Mycoplasmas* y artefactos del medio es la tinción de Dienes, con ella los *Mycoplasmas ureasa* negativos se colorean de azul, *Ureaplasma* no se tiñe y los artefactos pueden tomar un color violeta.

3) MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

En 1984, se demostró la producción de una proteasa de IgA1 capaz de fraccionar en dos fragmentos FAb y Fc en todos los 14 serovares.⁽¹⁷⁾ La especificidad de la enzima está restringida a la IgA1 del huésped que podría explicar la especificidad del microorganismo como patógeno en el tejido urogenital y respiratorio.⁽¹²⁾

Se ha observado que *U. urealyticum* ataca principalmente a eritrocitos y otras células eucarióticas, algunas otras cepas de serovares atacan a eritrocitos en suspensión; demostrándose la hemadsorción en eritrocitos de cobayos por el serovar 3, y en células HeLa probadas en 6 cepas humanas.⁽¹⁸⁾ También se cuestiona que los *Ureaplasmas* elaboran más de una toxina o productos tóxicos, pero aún es controversial debido a que no se ha confirmado.

Se sugiere que el cese brusco del crecimiento es causado por la acumulación de un factor tóxico, como la catalasa resistente termoestable y dializable; pero aún no se conoce la identidad del posible factor tóxico que producen las cepas de estos microorganismos. Se ha establecido que cuando se presenta la hidrólisis por *Ureaplasma*, al producir amonio provoca un cambio local de pH, siendo tóxico para las células y tejidos *in vitro* e *in vivo*, parece ser que el amonio produce pequeñas áreas de lesión en la célula, sobre la mucosa uretral (glándula mucosa y conductos de Littreé); esto es posible por la acumulación local del ión amonio sobre las membranas de las mucosas, contribuyendo de esta manera a la patogenicidad potencial de los *ureaplasmas*. Este efecto citopático ha sido observado en cultivos celulares, también puede causar aberraciones

cromosómicas observados en cultivos de linfocitos humanos y es probable que la producción de peróxido sea el responsable de la lisis de los eritrocitos.⁽³⁾

En otros estudios se ha demostrado en 3 serovares la actividad de la fosfolipasa A y C de *U. urealyticum*, por lo que se ha postulado que esta enzima puede degradar fosfolípidos de placenta y traer como principio al parto prematuro.⁽¹⁹⁾ El papel de estas fosfolipasas, en abortos espontáneos, óbitos y prematuridad producidos por *U. urealyticum* no está bien definido.⁽²⁰⁾

Las evidencias sugieren que los ecosanoides, productos del metabolismo del ácido araquidónico, son importantes en la regulación homeostática del tono vascular pulmonar. La fosfolipasa A2 es un estímulo para la producción de hipertensión pulmonar probablemente por el mismo mecanismo propuesto para los estreptococos y otras bacterias.^(1, 21)

Las sugerencias en el papel etiológico de la artritis reactiva de los Ureaplasma su ponen que estos de manera espontánea se unen al neutrófilo siendo fagocitado y no destruido en la presencia de complemento y en ausencia de anticuerpos lo cual es común en pacientes hipogammaglobulinémicos, los neutrófilos semejan tener un papel defensivo en pequeña proporción facilitando la diseminación de la infección.⁽²²⁾

Se ha observado la capacidad de adhesión del agente a las células de la mucosa genitourinario, y la producción de sustancias tóxicas que llevarían a la destrucción del epitelio con respuesta inflamatoria aguda o subaguda de la misma, con la consecuente aparición de signos de enfermedad, además produce cilioestasis y lesión de mucosas en cultivos de traquea fetal demostrado en animales de experimentación inoculados con ureaplasmas.^(8, 23)

4) EPIDEMIOLOGIA

Se conocen 12 especies de Mycoplasmas que afectan al hombre de ellos se tienen principalmente a *U. urealyticum* junto con *Mycoplasma hominis* de los que son aislados más frecuentemente en el tracto genital femenino y son los que causan enfermedades en los recién nacidos prematuros.

Se ha reportado que *U. urealyticum* está implicado en una amplia variedad de infecciones: uretritis, infección del tracto urinario, corioamnioitis, aborto espontáneo, enfermedad pélvica inflamatoria y neumonía en recién nacidos; también se tienen evidencias de que puede provocar infertilidad y esterilidad, pero aún no se han confirmado estas evidencias.⁽²⁵⁾ Se le conoce como un germen patógeno oportunista en recién nacidos,⁽²²⁾ y en personas inmunodeficientes.^(6, 26)

La colonización por *U. urealyticum* y *M. hominis* en el tracto genital inferior de individuos femeninos y masculinos ocurre con frecuencia en la pubertad al inicio de la actividad sexual.

Se ha observado que *U. urealyticum* es aislado con menor frecuencia aislado de la orina, aunque se ha reportado su aislamiento en la vagina en un 40 a 80% de mujeres sexualmente maduras asintomáticas.⁽²³⁾ La incidencia es poco frecuente en la uretra inferior de pacientes masculinos normales, sin embargo en las mujeres se han encontrado factores de riesgo para la colonización como la edad joven, estado socioeconómico bajo, actividad sexual con partners múltiples, grupo étnico (raza negra o blanca) y usos de anticonceptivos orales.

Debido al gran porcentaje de aislamientos de *U. urealyticum* en mujeres sexualmente activas, las infecciones por este microorganismo patógeno se ha incorporado a las enfermedades transmitidas por contacto sexual; en las mujeres prepúberes y en las posmenopáusicas se le ha encontrado como un germen único en un 6 a 22%. También se le ha identificado un 50% en la enfermedad pélvica inflamatoria; y se le ha aislado esto hace que se le incluya en el estudio de infertilidad. En estas mujeres se les ha aislado sin demostrar que les cause enfermedad.

En 1980 se encontró que *U. urealyticum*, fue causa de corioamnioitis aguda en un 22%, este resultado junto con el de otros autores proporcionaron evidencias de la importancia de esta especie como causa de cambios inflamatorios en el útero grávido y el feto.^(8, 23, 27)

La transmisión vertical de *U. urealyticum* de madres se da en el útero durante el parto. Se ha reportado que en los infantes de término la transmisión vertical es de 45 a 66%. estos reportes no son significativos y difieren por la transmisión vertical

del 58% de infantes pretérmino encontrado por Sánchez y Regan,⁽²⁾ En otros reportes se menciona que la colonización en infantes es frecuente a los 3 meses de edad; y menor al 10% en niños y adultos sexualmente inexpertos son colonizados y se incrementa por la actividad sexual después de la pubertad.⁽²⁸⁾

Russell documentó la correlación existente entre corioamnioitis aguda, parto pretérmino y la presencia de sepsis neonatal en las primeras 48 horas de nacimiento en aproximadamente la cuarta parte de los neonatos cuyas placentas mostraron corioamnioitis, estas evidencias fueron raras en ausencia de inflamación placentaria.^(3, 27, 29) En la neumonía congénita o neumonía adquirida durante el nacimiento es frecuente que se tenga el antecedente materno de corioamnioitis, por *U. urealyticum*, lo cual causa neumonía congénita.^(4, 16, 29) Un estudio reciente realizado por J. Ollikainen et al, examinó la colonización y mortalidad neonatal de *U. urealyticum* de 78 infantes con edad gestacional de 34 semanas, de los que 11 (14%) muestras de aspirados endotraqueales fueron positivas a *U. urealyticum* determinando la colonización asociada con signos de enfermedad del huésped y síntomas del tracto respiratorio, sugiriendo la importancia de la patogenicidad de *U. urealyticum* en infantes pretérmino.⁽³⁰⁾

La mucosa del tracto genital masculino probablemente se encuentre menos expuesta, lo que se refleja en la recuperación menos frecuente de Mycoplasmas del tracto genital de los lactantes varones. Se han aislado Mycoplasmas principalmente *U. urealyticum*, de la nariz y la garganta alrededor del 15% en lactantes del sexo femenino y masculino, estas cifras son estimaciones y varían de una población a otra, dependiendo de la porción de mujeres embarazadas que se hallan colonizadas.

La colonización neonatal suele no persistir más allá de los tres meses de edad; cuando los Mycoplasmas persisten lo hacen con mayor frecuencia en las niñas. Es por ello que es raro recuperar Mycoplasmas genitales de varones prepuberales; en un estudio se encontró que una quinta parte de las niñas prepuberales estaban colonizadas por *U. urealyticum* y 6% de *M. hominis*. En niños que sufren abuso sexual el microorganismo se halla con mayor frecuencia.⁽²⁸⁾

A) MORTALIDAD Y MORBILIDAD

Varios estudios han mostrado la asociación significativa entre el aislamiento de *U. urealyticum* del corioamnios y la mortalidad y morbilidad perinatal. De esta manera la morbilidad y la mortalidad es el resultado de efecto directo de infección fetal; debida que *U. urealyticum* tiene una asociación de complicaciones con el nacimiento prematuro. Un número de estudios prospectivos basados en cultivos directos en el sitio de infección, indican que *U. urealyticum* y *M. hominis* pueden causar enfermedad invasiva, en infantes y son una causa de mortalidad y morbilidad perinatal particularmente en infantes prematuros.

B) COLONIZACION EN ADULTOS

Luego de la pubertad, la colonización con Mycoplasmas en el tracto genital ocurre durante el contacto sexual;^(31, 32) se ha observado que en personas sexualmente maduras que carecen de historia de contacto sexual es raro que esten colonizados, la frecuencia aumenta en individuos sexualmente activos. Se han aislado Mycoplasmas del tracto genital con mayor frecuencia en hombres y mujeres de raza negra que de blanca, pero aun no es claro el grado en que esta diferencia se debe a distinta experiencia sexual.

En un estudio realizado en Boston se aisló *M. hominis* en alrededor de la mitad de los pacientes clínicos de un hospital municipal y los ureplasmias se aislaron 3 cuartas partes de ellos. En contraste en los pacientes que visitan a obstetras y a ginecólogos privados de una misma región, se aisló a este microorganismo en una quinta parte y la mitad respectivamente.⁽³¹⁾ La colonización genital por mycoplasmas también se relaciona con la condición socioeconómica, pero se desconoce si ésta aparente diferencia es un reflejo de la experiencia sexual o si están involucrados otros factores como: anticoncepción, menstruación, embarazo y cambios menopáusicos.⁽³²⁾ Se ha reportado que los Mycoplasmas del tracto genital parecen aislarse con mayor frecuencia de mujeres embarazadas y se aíslan con menor frecuencia luego de la menopausia, de modo que las hormonas sexuales pueden tener influencia en la colonización.

C) COLONIZACION MATERNA

La colonización por *U. urealyticum* en el tracto reproductivo femenino, se ha postulado como una causa de riesgo prenatal, incluyendo aborto recurrente, corioamnionitis, parto pretérmino, bajo peso al nacimiento (BPN), mortinato y morbilidad materna de post-parto febril. Recientemente *U. urealyticum* fue aislado del tracto genital inferior (cérvix o vagina), y se le ha asociado con el parto pretérmino, mientras que su aislamiento de la placenta se asocia con corioamnionitis histológica y nacimiento pretérmino,^(13, 34)

La colonización materna por *U. urealyticum* es común, se ha reportado en 70% de mujeres embarazadas.^(35, 36) El microbio es transmitido al infante recién nacido durante el parto, y en infantes de término completo colonizados por este microorganismo se le asocia con la enfermedad del sistema nervioso central y respiratorio.^(37,38)

En un estudio realizado en 1995 se encontró la colonización por *U. urealyticum* de 20 a 25%, en muestras tomadas de placentas;⁽³⁶⁾ por otro lado la infección en la corioamnionitis es ascendente, pero la colonización maternal no se le asocia con la labor pretérmino.^(3,33)

La alta colonización en la vagina de mujeres embarazadas, ha traído diversas confusiones en los resultados adversos perinatales incluyendo la colonización con otros microorganismos y de limitaciones inherentes a estudios designados.

U. urealyticum es considerado como una especie patógena capaz de provocar infección materna y fetal severa, siendo algunas veces fatal para el feto o el neonato. Se ha descrito el papel de los *Mycoplasmas* genitales en infecciones intramnióticas, el cual involucran al tiempo prolongado de incubación de los microorganismos, y el número de examinaciones, las cuales pueden contribuir a la colonización intrauterina y a infecciones intrauterinas en mujeres parturientas.

U. urealyticum se ha relacionado con patologías clínicas.⁽³⁰⁾ La colonización por este microorganismo en el tracto genital inferior de mujeres embarazadas no indica el incremento de riesgo de enfermedad sintomática.

- Colonización en el tracto genital superior

La colonización del endometrio por *U. urealyticum* de mujeres no embarazadas ocurre microscópicamente fuera de los signos de inflamación.⁽³⁹⁾ Un incremento de riesgo de tres veces ocurre en la endometritis; sin embargo a pesar del uso de terapia intraoperatoria de antimicrobianos profilácticos de rutina, el corioamnios fue colonizado por *U. urealyticum* en el parto por cesárea, y un incremento de riesgo de ocho veces ocurrió al comienzo de la labor espontánea en mujeres colonizadas en el corioamnios.⁽⁴⁰⁾

La colonización del líquido amniótico por *U. urealyticum* en el tiempo de la amniocentesis y examen genético en 16 a 20 semanas de edad gestacional, ocurrió entre 0.3% y 3.0% de los embarazos.^(41, 42, 43, 44) En dos de estos estudios^(43, 44) se observó una asociación entre resultados positivos de cultivos y embarazo adverso. Ambos estudios limitados, debido a resultados evaluados incompletos. *U. urealyticum* fue el microorganismo más comúnmente aislado del líquido amniótico de mujeres quienes presentan signos de infección en la labor pretérmino después de la pre labor de ruptura de membranas, la cual ocurre aproximadamente en una tercera y una mitad de pacientes respectivamente.^(41, 45) En algunos datos clínicos se han observado niveles elevados de interleucina 6 en el líquido amniótico⁽⁴¹⁾ y se les ha buscado la serología sistémica identificando un subgrupo de pacientes con un incremento de riesgo en resultados adversos. *U. urealyticum* es recuperado de placenta, asociándose con el incremento prematuro de ocho veces al principio de la labor.⁽⁴⁶⁾ Estos estudios apoyan la asociación de colonización en el tracto genital superior, con resultados de embarazos adversos, incluyendo la prelabor y labor pretérmino en la ruptura de membranas y endometritis post-partum.

D) TRANSMISION DE LA MADRE AL RECIEN NACIDO

Se ha observado que en mujeres infectadas, *U. urealyticum* es transmitido en el parto através del canal de nacimiento en un 48 a 58% de los nacimientos.⁽²⁾

Cassell et al., obtuvo aislamientos de *U. urealyticum* de cultivos puros del corioamnios, fluido amniótico y órganos fetales internos, en presencia de sinusitis y neumonía. Existen evidencias que la infección fetal puede ocurrir en el útero.⁽³⁹⁾

En otro estudio se observó que 14% de *U. urealyticum* y 30% de *M. hominis* fueron aislados de muestras endotraqueales colectadas durante las primeras 12 a 24 horas después del nacimiento en infantes menores de 2,500 g nacidos por sección de cesárea con membranas intactas, indicando que la transmisión ocurrió en útero de infantes prematuros. En otra investigación se reportó 48% de aislados de *U. urealyticum* de aspirados endotraqueales colectados después de 30 minutos del nacimiento por sección de cesárea y membranas intactas.⁽³⁷⁾ Por lo que la adquisición de este microorganismo puede ocurrir en útero por vía ascendente, por colonización del tracto genital de las madres y por vía transplacentaria de sangre de la madre.^(47, 48) En otro estudio se reportó la transmisión vertical por *U. urealyticum* en un 18 a 55% entre los infantes prematuros.⁽⁴⁹⁾

Algunos estudios reportan que, la forma de transmisión no se encuentra afectada por el tipo del nacimiento del niño (cesárea o parto normal), pero algunos autores afirman un incremento significativo al nacer el niño por el canal del parto y por el rompimiento prematuro de membranas.^(2, 3) Además se menciona que *U. urealyticum* es aislado del líquido amniótico en edad de 16 a 20 semanas de gestación en ausencia de parto, por lo que produce corioamnionitis y en aislados de placenta se ha demostrado una fuerte asociación con la corioamnionitis.⁽³⁾

5) CARACTERISTICAS CLINICAS

Inicialmente se sabía que los Mycoplasmas causaban infecciones en animales, sin embargo hoy se sabe que *U. urealyticum* produce en humanos amnioitis, prematuridad, aborto espontáneo, infertilidad, bajo peso al nacimiento, neumonía, meningitis y muerte por amniocentesis, infección del tracto urinario, enfermedad pélvica inflamatoria, también se ha reportado que es capaz de infectar el líquido amniótico sin que exista ruptura de membranas y de esta manera colonizar el

producto.⁽³⁹⁾ Además causa infección intrauterina crónica que se caracteriza por una reacción inflamatoria intensa.⁽⁵⁰⁾ Sin embargo, las personas colonizadas por esta especie con frecuencia no muestran ningún síntoma de enfermedad, en algunos casos puede formar parte de la flora normal.⁽⁵²⁾

En el Instituto Nacional de Perinatología, Narcio y cols., encontraron 21.5% de colonización por *U. urealyticum* en mujeres embarazadas, por lo que se da su relación con septicemia y meningitis. En otros estudios se ha observado que la colonización por *U. urealyticum* se asocia a enfermedad pulmonar crónica (EPC) y la inmadurez en recién nacidos.⁽⁵¹⁾ En un estudio realizado en niños de 23 a 41 semanas de gestación se encontró una alta asociación con la inmadurez y el desarrollo de enfermedad pulmonar crónica (EPC). Roulón y colegas, informaron un caso con ruptura prematura de membranas, amnionitis y septicemia en una paciente con 21 semanas de gestación, en el que *U. urealyticum* fue el único aislado en los cultivos.

A) INFECCIONES EN VIAS URINARIAS

a) URETRITIS NO GONOCOCICA (UNG).

Esta enfermedad inicialmente fue observada en pacientes infectados por Mycoplasmas en los años cincuenta. Actualmente se han realizado numerosos estudios relacionados con el papel de los Mycoplasmas en la uretritis no gonocócica, se ha observado que la mayoría de ellos no son considerados como causa importante de esta enfermedad, dado que se aíslan con poca frecuencia en pacientes en estados de salud o enfermedad.⁽⁵⁾

En otros estudios se ha inoculado Ureaplasma en animales inmunocomprometidos y se tienen evidencias de causar uretritis no gonocócica, en ausencia de Chlamidia.⁽³⁾ Es común la asociación de *U. Urealyticum* con *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* en la uretritis no gonocócica. La frecuencia de aislamiento de Ureaplasma en hombres sanos sugiere que el microorganismo unido a ciertos factores predisponentes, así como la falta de inmunidad de las mucosas, son los factores por los cuales algunos individuos desarrollan la enfermedad.⁽³⁾

Se tienen dos condiciones de infección por *U. urealyticum* en tracto urinario, uretritis no gonocócica en varones y cálculos urinarios. Es común la ocurrencia de Ureaplasma en la uretra de hombres asintomáticos, ciertos serovares de estos microorganismos son patógenos asociados con ciertos factores predisponentes.

U. urealyticum produce ureasa y se ha observado en modelos animales la formación de cálculos infecciosos debido a que esta enzima produce cristalización "in vitro" de fosfato de calcio en orina y se sugiere que este se encuentra implicado; no existen evidencias de que cause pielonefritis.⁽³⁾

b) PROSTATITIS Y EPIDIDIMITIS

Los Ureaplasmas pueden tener acceso a la próstata durante una infección aguda de uretra, siendo más frecuente el aislamiento en pacientes con uretroprostatitis aguda, en contraste se ha podido recuperar cepas directamente del epididimo de un paciente con orquioepididimitis aguda no Chlamidial, no gonocócica y con desarrollo de anticuerpos específicos, lo cual muestra que *U. urealyticum* puede ser una causa no común de esta enfermedad.⁽³⁾

B) OTROS ASPECTOS

En algunos estudios sobre fertilidad masculina, se ha recobrado a *U. urealyticum* del semen en 47% varones, los datos obtenidos del análisis del semen son: Baja motilidad de los espermatozoides, formas aberrantes y bajo número de espermias comparado con el semen de varones que no tenían el microorganismo; en el caso de mujeres se ha identificado un 50% de enfermedad pélvica inflamatoria lo que sugiere se incluya en el estudio de infertilidad.

En la fiebre postparto, se ha aislado de sangre y en algunos casos no ha persistido la invasión, ya que la paciente se recupera de manera espontánea. Se ha recuperado además de la glándula de Bartolin y en pacientes con enfermedad de artritis reumatoide; no se ha aislado de conductos deferentes. Es conveniente descartarlo como un agente etiológico en las infecciones cervicovaginales.^(1 57)

U. urealyticum coloniza el tracto genital inferior del huésped normal, pero es causante de infección extragenital en pacientes de ambos sexos entre los 14 y 76

años de edad; algunas investigaciones han reportado casos de infección extragenitales por accidente, observándose la implicación en un paciente hipogammaglobulinémico con artritis séptica^(3, 53) y en pacientes inmunocomprometidos.⁽⁵³⁾

6) FACTORES QUE FAVORECEN LA COLONIZACION EN EL RECIEN NACIDO

A) PREMATUREZ

El nacimiento prematuro es uno de los problemas clínicos en obstetricia. En la proporción de niños prematuros nacidos con bajo peso no se aprecia cambio desde los años de 1950 's, la proporción de niños de bajo peso al nacimiento es alta al Oeste de la región industrializada de los Estados Unidos.⁽⁵⁸⁾

Las primeras sugerencias de infección pueden involucrar nacimiento prematuro con peso al nacer \leq a 2500 gr. En 1970, en 13 estudios aproximadamente se incluyeron a 12,000 pacientes para la evaluación del papel de infección de ureaplasma en el cérvix sobre el nacimiento prematuro. Las evidencias sugieren que las relaciones no fueron consistentes en la presencia de *U. urealyticum* en el tracto genital inferior de las madres y el peso al nacimiento.⁽³⁾

B) BAJO PESO

Un estudio realizado en poblaciones de alto riesgo indicó una asociación significativa entre el aislamiento de *U. urealyticum* de placenta y bajo peso al nacimiento.⁽³⁾ además se observó que cinco niños de bajo peso al nacimiento (\leq a 1500 g) colonizados por *U. urealyticum*, desarrollaron displasia broncopulmonar y 21 niños con bajo peso al nacer no colonizados, sólo 7 desarrollaron displasia broncopulmonar.⁽³⁶⁾ Por lo tanto se infiere en este estudio que los niños pretérmino de bajo peso al nacimiento son más susceptibles de adquirir colonización por *U. urealyticum* en su aparato respiratorio y se tiene mayor riesgo en desarrollar displasia broncopulmonar.⁽³⁶⁾ Edward y cols. demostraron que el fenómeno de bajo peso al nacer ocurre más frecuente en mujeres quienes tienen anticuerpos de

riesgo de tipo específico reciente durante el embarazo, por lo que se sugiere el papel etiológico del bajo peso al nacer en mujeres de partos prematuros.⁽⁵⁹⁾

C) VAGINOSIS BACTERIANA

El diagnóstico de vaginosis bacteriana esta basado en la presencia de los siguientes criterios:

- 1) pH vaginal de 7.5
- 2) Presencia de olor amina en vagina
- 3) Presencia del fluido vaginal con células epiteliales con bacilos
- 4) Presencia de secreción vaginal de consistencia uniforme
- 5) Detección de pocas células blanco y flora mixta (no histobacilos) tinción Gram del fluido vaginal.⁽⁶⁰⁾

En un estudio de cohorte de 10,397 mujeres embarazadas se correlacionó la vaginosis bacteriana con colonización por *U. urealyticum* y predilección del parto pretérmino de infantes con bajo peso al nacimiento. Se ha reportado que la vaginosis bacteriana se presenta en 15 a 20% de mujeres embarazadas, la mitad de estas pacientes no presentan sintoma o molestia alguna.⁽⁶¹⁾ *U. urealyticum* no se encuentra asociado con la vaginosis bacteriana, pero si se le encuentra un incremento en la colonización vaginal.

Hill y colb.⁽⁶¹⁾ determinaron la relación de recuperación de algunos microorganismos que causan vaginosis bacteriana del corioamnios, los más aislados en el estudio, fueron *U. urealyticum*, *M. hominis*, *G. Vaginalis*, *Peptostreptococcus* y *Bacteroides sp*. Los organismos que causan vaginosis bacterian aumentan la síntesis de fosfolipasa A y la producción de prostaglandinas, las cuales pueden conllevar al parto pretérmino, la ruptura de membranas y la invasión de otros microorganismos. La presencia de vaginosis bacteriana está asociada independientemente y significativamente con el incremento a 37 semanas de gestación.

La colonización cérvico-vaginal por *U. urealyticum* no es predictiva al riesgo de embarazo, puede invadir el tracto genital superior, hacerlo solamente una

subpoblación de individuos infectados por *U. urealyticum* en el tracto genital inferior.⁽⁶¹⁾

7) ENFERMEDADES QUE CAUSAN EN EL RECIEN NACIDO

A) NEUMONIA

Un número de casos reportados se ha descrito a *U. urealyticum* como causa y asociación con neumonía congénita. Clínicamente y radiológicamente la neumonía en la etapa temprana no es fácil de distinguir; la enfermedad respiratoria en la inmadurez pulmonar esta mediada por la deficiencia de surfactante considerándose la posibilidad de sepsis y/o neumonía en recién nacidos.

Quinn y colaboradores, reportaron a *U. urealyticum* como una causa de neumonía neonatal.⁽⁶²⁾ Estos organismos fueron obtenidos de las secreciones genitales de infantes a término fallecidos a las 74 hrs de edad por neumonía neonatal.

En una revisión bibliográfica Ohlsson y colaboradores describieron dos estudios de cohorte, donde se analizó la sangre de pacientes infectados por *U. urealyticum*.⁽⁶³⁾ Durante el segundo y tercer día de vida, se observó un incremento significativo en el conteo total de células, neutrófilos, madurez e inmadurez de neutrófilos. Panera y colaboradores confirmaron estas observaciones del conteo de células y la asociación de neumonía y colonización por *U. urealyticum* en un grupo separado de 29 niños (64); se ha observado la relación de neutrófilos y la colonización en el aspirado traqueal,⁽⁶⁵⁾ como mediadores de la inflamación detectadas más frecuente en las secreciones pulmonares de infantes colonizados.^(22, 66, 67, 68) Además en los aislados de recién nacidos humanos se induce neumonía; y en experimentos se ha inducido la neumonía en ratones recién nacidos infectados y en baboons prematuros.^(39, 69) En estas investigaciones, se tiene la identificación de *U. urealyticum* alta entre pacientes con neumonía, y es el responsable de inducir inflamación en pacientes infectados. El aislamiento endotraqueal por *Ureaplasma* representa el papel de infección del tracto respiratorio inferior, indicando el aislamiento inicial por este

microorganismo de 1000 y algunos casos exceden de 10,000 unidades cambiantes de color.

En un estudio 292 infantes con peso al nacimiento menor a 2500 g y con desarrollo a 28 días después de nacimiento, se aisló *U. urealyticum* de aspirado endotraqueal en los primeros 7 días de nacimiento (edad de 1.3 días) asociada con evidencia radiográfica de neumonía, comparado contra infantes no infectados.⁽⁷⁰⁾

U. urealyticum puede inducir cilioestasis y lesión de mucosa en humanos de cultivos de tráquea y feto. Recientemente *U. urealyticum* se asocia al síndrome de dificultad respiratoria (SDR) y al fracaso respiratorio, la cual se define como la necesidad de ventilación oscilatoria de alta frecuencia, alta oxigenación inspirada y presión inspiratoria alta.⁽⁵⁾

Se ha observado el síndrome de dificultad respiratoria (SDR) en 24 de 47(51%) infantes colonizados y 10 de 40(25%) infantes no colonizados ($P<0.01$); la dificultad respiratoria severa se presentó en 37 de 47(74%) colonizados y 28 de 51(55%) infantes no colonizados ($P<0.05$), estos fueron menores a 34 semanas de edad gestacional; en este estudio la colonización fue definida como el aislamiento de *U. urealyticum* de aspirados nasofaríngeos.

En 1976 Tafari et al. aislaron a *U. urealyticum* en pulmón de 42 de 290 infantes mortinatos en asociación con evidencia histológica de neumonitis. Esta fue una de las investigaciones que sugirieron el papel potencial de este microorganismo en la enfermedad perinatal: desde entonces se han descrito casos de aislamiento de *U. urealyticum* en el feto y tejido pulmonar.^(22, 38, 69) Quinn et al. encontraron la asociación entre el metabolismo inhibitorio de anticuerpo responsable por Ureaplasma y enfermedad respiratoria en infantes recién nacidos, se observó una mortalidad alta en neonatos con enfermedad respiratoria y anticuerpos elevados de Ureaplasma, sin embargo, estos resultados fueron difícil de interpretar debido a criterios de definición de enfermedad respiratoria.⁽⁷⁰⁾

Taylor Robinson et al., de las muestras de aspirados de tráquea y gástrica obtuvieron 47 infantes con dificultad respiratoria y 49 controles similares a la edad gestacional, los cultivos se realizaron a unas cuantas horas después del

nacimiento. *U. urealyticum* se aisló en 29% infantes prematuros, pero no fue una evidencia clara de que el microorganismo haya contribuido a la dificultad respiratoria.⁽⁵⁾

Quinn et al., determinó un caso fatal con neumonía ureaplasma en neonatos asociado con el título elevado de anticuerpos del serotipo 8 (serotipo 8 de *U. urealyticum* aislado de pulmón), localizado en la lesión de inflamación del pulmón, implicando al microorganismo como un agente causal.⁽⁶²⁾

Waites et al.⁽⁹¹⁾ describieron en infantes recién nacidos con peso al nacimiento 2200 g y edad de 33 semanas de gestación el aislamiento de *U. urealyticum* del tracto respiratorio inferior, en asociación con hipertensión pulmonar persistente y neumonía, con severa asfixia, obteniendo cultivos positivos de sangre, aspirado traqueal y líquido pleural, en un caso se presentó muerte post natal de seis días. La autopsia reveló neumonía bilateral severa por mezcla de exudado inflamatorio celular intrainflamatorio y cambios fibróticos en la displasia broncopulmonar, sugiriendo que *U. urealyticum* es capaz de producir neumonía en infantes recién nacidos prematuros.

B) MENINGITIS

La incidencia de meningitis bacteriana es mayor durante el periodo neonatal que en cualquier otro periodo de vida, se ha visto que *U. urealyticum* se aísla del líquido cefalorraquídeo (LCR) en 8 de 100 infantes recién nacidos y un caso de meningitis por *E. coli*.⁽³⁸⁾ En cuatro de estos niños infectados, el organismo fue aislado de aspirado endotraqueal, 6 de ocho niños tuvieron hemorragia intraventricular, comparado con 6 de 42 aislados de *U. urealyticum*, solo se reportó un caso de un infante prematuro con presencia de *U. urealyticum* en el líquido cefalorraquídeo en 31 días de nacimiento.⁽⁸⁸⁾

En reportes previos *U. urealyticum* se aísla frecuentemente del líquido cefalorraquídeo de infantes pretérmino,^(38, 88) estos resultados y el papel de infección de estos organismos aún no son claros.

En un estudio prospectivo Gail Casell y col, en búsqueda de meningitis encontraron en 100 infantes prematuros, 8 aislados de *U. urealyticum* en el

líquido cefalorraquídeo y 5 por *Mycoplasmas hominis* de las cuales 6 infantes presentaron *U. urealyticum* con hemorragia severa intraventricular y tres con hidrocefalia, mientras que 57 aspirados endotraqueales se encontraron 16 cultivos positivos por *U. urealyticum* y 9 para *M. hominis* y 2 fueron en ambos organismos. La infección por *Ureaplasma* se asoció con la hemorragia severa intraventricular.⁽⁵⁴⁾ La cronicidad es característica de *U. urealyticum* y *M. hominis* en la infección del líquido amniótico. Estos organismos pueden persistir en niños prematuros de 16 a 20 semanas de gestación considerando que los *Ureaplasmas* pueden persistir durante dos meses en el líquido amniótico, con presencia de inflamación, también se ha observado que ambos organismos persisten durante muchos meses en la inflamación crónica de articulaciones en pacientes hipogamaglobulinémicos.

La ruta precisa de infección por *Mycoplasmas* en la enfermedad del Sistema Nervioso Central no se ha establecido con certeza en algunos de los casos, pero se ha observado que la infección maternal (incluyendo colonización en el tracto urinario), corioamnionitis y la infección después de la ruptura de membranas prolongada están relacionados con el desarrollo de meningitis bacterial en infantes recién nacidos, por lo tanto tales condiciones predisponen la infección en el Sistema Nervioso Central por *Mycoplasmas*.^(55, 56)

C) ENFERMEDAD PULMONAR CRÓNICA (EPC) O DISPLASIA BRONCO PULMONAR (DBP)

La Enfermedad Pulmonar Crónica (EPC) se define como el requerimiento de oxígeno persistente a 36 semanas de gestación, y de asistencia de ventilación mecánica. Esta se basa en el suplemento de oxígeno de 28 días.^(73, 87.) La displasia broncopulmonar en la fase crónica causa daño en el neonato, debido a la presencia del daño oxidante y barotrauma susceptibles en infantes prematuros.^(83, 84) Sin embargo el daño pulmonar es mediado por la interacción compleja del factor de inflamación y fibrosis.^(85, 86, 87) El desarrollo de EPC es uno de los problemas del cuidado de infantes de muy bajo peso, niños pretérmino, y edad de 30 semanas de gestación.

La importancia de los ureaplasmas en cultivos puros de 85% exceden de 10^3 aproximadamente 300 UCC y un 26% en cultivos de sangre en el desarrollo de EPC. La cuestión de asociación por estos microorganismos con otras causas de muerte de EPC coinciden con el desarrollo patológico prematuro, por lo cual se ha propuesto que *U. urealyticum* no es causa primaria de neumonía no detectable y no tratable, en resultados de incremento de requerimiento de oxígeno y desarrollo subsecuente de EPC dando como resultado la toxicidad del oxígeno.^(22, 37, 72, 74)

Se ha reportado que *U. urealyticum* se aísla de muestras de tráquea, pulmón, sangre, líquido pleural y líquido cefalorraquídeo de infantes prematuros.^(37, 75) La presencia de este organismo en la tráquea de infantes de peso al nacimiento < 1000 g se le asocia con el incremento de incidencia de EPC; por lo que la prematuridad, ventilación a presión positiva con asistencia de oxígeno, infección por *U. urealyticum* y *M. hominis* son implicaciones asociadas con desarrollo de EPC en el neonato prematuro. Se ha observado el aislamiento de *U. urealyticum* en aspirado traqueal de peso nacimiento \leq 1250 g en las primeras 24 horas de nacimiento, se asocia con el incremento de riesgo de desarrollar displasia broncopulmonar considerando esta asociación independiente del peso nacimiento.

O. Brodovich y Merritt; propusieron el daño pulmonar agudo neonatal, mediante el diagnóstico radiológico clínico y anomalías de tensión de gas sanguíneo de 28 días de vida.^(76, 77)

En un meta análisis de 17 estudios publicados, sumaron la relación entre *U. urealyticum* y el desarrollo de EPC. Todos los estudios a excepción de un caso control, de los estudios de cohorte la colonización fue primero determinada y la EPC fue luego diagnosticada. La colonización con *U. urealyticum* fue asociada con la EPC siendo el riesgo relativo de 1.72(95% CI 1.50-1.96).⁽⁷⁸⁾

Nathaniel R. Susan et. al.⁽⁹²⁾ analizaron la asociación de colonización por *U. urealyticum* y el desarrollo de EPC en 93 infantes prematuros, peso al nacimiento <1251 g tratados con surfactante, los cultivos de las muestras traqueales y nasofaríngeas fueron obtenidos de cultivos temprano y tardío de colonización de 2 ± 1 y 14 ± 1 días después del nacimiento; de los cuales se obtuvieron 17(18%) de cultivos positivos de los 93 infantes prematuros. En este estudio se confirmó la

asociación de colonización de *U. urealyticum* y el desarrollo de enfermedad pulmonar crónica.⁶⁵⁾

Por otra parte William F. Watsh et. al., reportán a *U. urealyticum* capaz de causar patológicamente lesión pulmonar en primates prematuros con enfermedad de membrana hialina.⁽⁷⁹⁾

Se ha considerado el papel patogénico de *U. urealyticum* en el desarrollo de EPC, Cassell et. al.⁽³⁹⁾ Quinn et. al.⁽⁶²⁾, examinaron en un infante muerto, el tejido fetal con cultivo positivo, inflamación aguda y peso al nacimiento 2750 g; además se detectó sepsis aguda y neumonía, falleciendo a los 3 días. La autopsia reveló la presencia de células polimorfonucleares, macrófagos vacuolados dentro de los ductos alveolares respiratorios y bronquios terminales siendo *U. urealyticum* el único organismo aislado en el exudado.

Wang et. al.⁽⁷⁵⁾ reportaron la enfermedad pulmonar crónica 5 a 10% de peso al nacimiento <1250 g. estos fueron colonizados por *U. urealyticum* en especímenes traqueales y nasofaríngea, en comparación con el 16% no colonizado, concluyendo que *U. urealyticum* contribuye independientemente a EPC con el efecto de ventilación, edad gestacional y enfermedad respiratoria inicial severa.⁽³⁷⁾

Mientras tanto Cassell et. al., aislarón *U. urealyticum* 17% de aspirados endotraqueales obtenidos durante las primeras 12 a 24 horas de nacimiento en 200 infantes con enfermedad respiratoria, peso <2500 g. (82%) y en infantes con peso <1000 g. fueron cultivos positivos y 41% fueron cultivos negativos, no encontrando asociación en el peso (>1000 g) de infantes infectados y con los de muy bajo peso y de infantes no infectados, aspectos demográficos y de otros factores de riesgo de EPC.⁽³⁷⁾

Riles y colb. 1996⁽⁸⁰⁾ encontraron una incidencia alta 60% de EPC en el tracto respiratorio bajo por otra parte Jonsson et. al.,⁽⁸¹⁾ mostraron el desarrollo de EPC es frecuente la asociación por colonización de *U. urealyticum*. En un estudio reciente realizado por B. Jonsson reportó la colonización por *U. urealyticum* se relaciona con el incremento de inmadurez, ruptura prolongada de membranas signo de corioamnionitis y parto prematuro. Sin embargo es posible que el

desarrollo de ureaplasma genital fortalece la asociación casusa efecto en el pulmón.⁽⁸²⁾

Gracias a los progresos recientes se ha reducido la mortalidad neonatal por el desarrollo de EPC en un 15 a 30% con peso nacimiento de <1500 g.

Estudios previos mencionan que la EPC y la colonización por Ureaplasma se correlacionan; de tal manera que el cuadro patológico corresponde a necrosis de los epitelios alveolares y bronquiales y reparación con metaplasia bronquial y fibrosis intersticial.

La incidencia de la EPC en infantes pretérmino fue 9.3% similar a lo reportado por Horowitz et al,⁽⁴³⁾ y el desarrollo de la EPC fue 46(3 %), en infantes de peso bajo al nacimiento ($\leq 1,500$ gramos) no ocurriendo en neonatos de peso $> 1,500$ gr. Los análisis de estos resultados, en los infantes de muy bajo peso demostraron que tales neonatos colonizados por *U. urealyticum* desarrollaron EPC, obteniendo una significancia de asociación de *U. urealyticum* con EPC y de muy bajo peso al nacimiento (MBPN).

En otros estudios se ha reportado en infantes pretérmino de bajo peso al nacimiento se relaciona con problemas respiratorios tales como la displasia broncopulmonar no obstante el tratamiento mejora en los neonatos con EPC entre 15 y 38%. En una revisión reciente hecha por Cassell et. al., la enfermedad por Ureaplasmas en infantes pretermino incluyó el metanálisis por Wang et. al. de 4 estudios de cohorte, donde el incremento de riesgo fue significativo, *U. urealyticum* fue aislado del tracto respiratorio entre las 24 a 72 horas de nacimiento y peso menor a 1250 g en infantes con EPC. Ellos especularon que *U. urealyticum* no fue causa de EPC, si no que la neumonía producida es el resultado por el incremento de requerimiento de oxígeno, y la EPC fue el resultado de la toxicidad del oxígeno.⁽³⁷⁾

D) SEPSIS NEONATAL

Se ha reportado que *U. urealyticum* es aislado 5% en sangre de niños neonatales con enfermedad pulmonar neonatal.⁽³⁸⁾ Por consiguiente se ha observado que ciertos factores asociados con la infección sanguínea por

ureaplasmas en neonatos de bajo peso al nacimiento ≤ 2.500 g, son más susceptibles a desarrollar una infección sistémica que en niños a término con peso de 2500 g. Un estudio realizado por Casell, encontró 34 niños de aspirado traqueales. 19 cultivos positivos para *U. urealyticum* representando el 24% de cultivos en sangre por este microorganismo, en reportes adicionales se ha descrito el aislamiento de Ureaplasma en sangre de neonatos asociados con neumonía.⁽³⁷⁾

E) HIPERTENSION PULMONAR PERSISTENTE

Waites et al.,⁽³⁸⁾ En infantes recién nacidos describieron el aislamiento de *U. urealyticum* en sangre y en tracto respiratorio inferior (aspirado endotraqueal) y tejido pulmonar en asociación con neumonía e hipertensión pulmonar persistente. Riles et al.⁽⁸⁰⁾ reportó un caso con neumonía Ureaplasma fetal y sepsis en un infante recién nacido con hipertensión pulmonar persistente. La autopsia reveló la formación extensiva de la membrana hialina combinada con inflamación en ambos pulmones.

8) SUSCEPTIBILIDAD Y RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

Se ha venido estudiando la eficacia del tratamiento antibiótico en la prevención de pérdidas fetales que se reducen 47 a 96% mujeres tratadas con doxiciclina antes de la concepción y 20% mujeres con eritromicina durante el embarazo.⁽⁸⁹⁾ Se ha determinado que *U. urealyticum* es sensible solo con algunos antimicrobianos como las tetraciclinas y eritromicinas, en un estudio in vitro se ha demostrado su resistencia a betalactámicos y aminoglucósidos.⁽¹¹⁾ Se piensa que la razón de la actividad menor de eritromicina a pH reducido es su mayor grado de ionización, dado que podría ser la causa directa de la actividad antimicrobiana.⁽¹⁶⁾ Los ureaplasmas son susceptibles a la acción inhibitoria a los siguientes antibióticos en orden decreciente de efectividad.

- | | |
|-------------------|-------------------|
| 1.- Doxiciclina | 7.- Cloranfenicol |
| 2.- Minoxiciclina | 8.- Estreptomina |

- | | |
|-----------------------|-------------------|
| 3.- Tetraciclina | 9.- Espectomicina |
| 4.- Eritromicina | 10.- Espiromicina |
| 5.- Clorotetraciclina | 11.- Kanamicina |
| 6.- Oxitetraciclina | 12.- Gentamicina |

Se ha reportado que *Ureaplasma* es resistente a la penicilina y derivados sintéticos como la ampicilina; y otros antimicrobianos como sulfamida, rifampicina, cefaloridina y lincomicina.⁽⁹⁰⁾

9) DIAGNOSTICO

A) CULTIVOS

El cultivo aún cuando es tardado sigue siendo de vital importancia en el diagnóstico de infecciones por *Ureaplasmas*. Para su aislamiento e identificación se emplea un medio líquido en combinación de un enriquecimiento y un medio sólido. Existen varios medios empleados para su crecimiento entre ellos se tienen al U9, U9B, E y actualmente se emplean el medio en caldo 10B y el agar en placa diferencial A7 y A8

- MEDIO STUART

El medio Stuart es un medio de transporte para preservar la viabilidad de las bacterias durante su transporte sin que haya una multiplicación de microorganismos, el tioglicolato de sodio se añade como un agente reductor para mejorar la recuperación de bacterias anaerobias, la pequeña cantidad de agar provee una consistencia semi sólida para impedir la oxigenación durante el transporte.

- MEDIO 10B

Este es un medio de enriquecimiento en caldo usado para el cultivo de *U. urealyticum* y otros micoplasma genitales, este contiene urea al 10% para que los

ureoplasmas metabolizan, produciendo amonio, incrementando de esta manera el pH pasando de ácido a básico, originándose el cambio de color en el medio de amarillo a rojo salmón.^(1, 3)

- MEDIO DE AGAR EN PLACA A8

Es un medio diferencial para el aislamiento de *U. urealyticum*, generalmente se emplea el principio bioquímico directo de urea para la ureasa, adicionando urea y un indicador sensible al amonio, como el cloruro de calcio (CaCl_2), este indicador produce un producto de reacción estable que es el óxido de calcio este se desarrolla dentro y sobre la superficie de las colonias impartiendo el color café a la colonia. Las formas de micoplasma como *Acholeplasma*, *Proteus* y formas L no dan esta reacción.⁽³⁾

En un estudio realizado por el Dr. Ken B. 1992 mencionan que los cultivos en agar en placa con antibiótico deben incubarse a 37 °C con 5% de CO_2 y 95% de N_2 .⁽¹¹⁾ A un cuando el uso de incubadores de CO_2 no suele recomendarse para pruebas estandarizadas de susceptibilidad,⁽¹⁶⁾ los Ureoplasmas son lo suficientemente capnofílicos que el incremento y obtención de un tamaño adecuado de colonias en agar justifica el uso de CO_2 para los aislados clínicos de bases reducidos;⁽¹²⁾ ciertos aditivos en agar A8, como CaCl_2 , son necesarios para la visualización adecuada de los microorganismos.⁽¹¹⁾

B) SEROLOGIA

Los Ureoplasmas que infectan al humano son antigénicamente distintos de otros Mycoplasmas; anteriormente 8 serotipos fueron propuestos por Black (1970-1973) y establecidos por pruebas serológicas comparativas empleando cuatro diferentes métodos serológicos: Inhibición metabólica, inhibición de crecimiento, inmunofluorescencia indirecta y hemaglutinación indirecta.⁽⁹³⁾

Lynn en 1980; describió la presencia de lipoglicanos que son polisacáridos unidos covalentemente a lípidos, estos son importantes por su propiedad inmunogénica en la producción de IgM en algunos serovares principalmente 4, 6, 8 y en menor el 3.⁽⁹³⁾

Para estudiar mejor el género por perfiles de proteínas y electroforesis se ha descrito un total de 14 serovares los cuales están separados en dos biotipos de acuerdo a la inhibición de crecimiento en caldo 10B con manganeso a una concentración de 1.0 M (biotipo 1 ó parvo biovar y biotipo 2 ó T960), el primero se conforma de los serovares 1, 3, 6 y 14, y los diez restantes se agrupan en el biotipo 2 T960, de los cuales la inhibición es permanente.

Las cepas de *Ureaplasma* aislados de animales no están relacionadas antigénicamente con las cepas humanas, algunas cepas de origen anormal han sido aisladas de carnero, cabra, simio, perro y bovinos.

Las pruebas serológicas empleadas para tipificar *Ureaplasma urealyticum* son diversas, siendo en la actualidad la prueba de ELISA, así como la fijación de complemento. ⁽³⁾

PRUEBAS EMPLEADAS EN LA SEROTIPIFICACION DE *Ureaplasma urealyticum*

Inhibición metabólica

Mycoplasmicida

Inmuno fluorescencia indirecta (HF)

Hemaglutinación indirecta (IA)

Inmunoensayo enzimático (ELISA)

Inmunoperoxidasa Indirecta (IP)

Inhibición Metabólica: La técnica consiste en crecer en una microplaca de ELISA a *U. urealyticum* con anticuerpos específicos y títulos de inhibición del metabolismo, registrando el cambio primero de color de las diluciones del anticuerpo comparado con los pozos controles del antígeno en los que únicamente se adicionó medio 10B en lugar de anticuerpo y células de *U. urealyticum*.

Micoplasmicida: La técnica consiste en incubar a *U. Urealyticum* con micoplasmicida (Solución Buffer-fosfato) en una microplaca de ELISA durante una hora para eliminar a *U. urealyticum* y observar las diluciones con anticuerpos específicos y observar el cambio de color en las diluciones del anticuerpo

comparado con el control en los que se tiene el medio con el crecimiento de *U. urealyticum*.

Inmunoensayo enzimático (ELISA): En esta técnica se utiliza una reacción enzimática como indicador de la interacción antígeno-anticuerpo. En la mayoría de los sistemas empleados, el componente de la reacción se une a una fase sólida (generalmente de poliestireno) y sobre él se fijan secuencialmente los demás componentes por una serie de reacciones antígeno-anticuerpo. Finalmente estas reacciones se ponen de manifiesto por una reacción enzima-sustrato. Ya que una sola molécula de enzima puede catalizar la conversión de un gran número de moléculas de sustrato, el uso de una enzima en un sistema de reacción puede aportar un potencial de gran amplificación de la reacción antígeno-anticuerpo que se busca, en este caso a *U. urealyticum*.

Inmunofluorescencia Indirecta (IIF): Un anticuerpo primario sin marcar se pone de manifiesto por un anticuerpo secundario marcado dirigido contra la inmunoglobulina de la especie de la bacteria la cual el anticuerpo primario se prepara. Este método es muy sensible debido a que algunos anticuerpos secundarios pueden reaccionar con diferentes sitios antigénicos sobre el anticuerpo primario.

Inmunoperoxidasa Indirecta (IP): Permite visualizar la reacción antígeno - anticuerpo, para ello se hidratan los frotis con PBS, bloquear la peroxidasa endógena, lavar con PBS y bloquear con albúmina sérica, lavar nuevamente con PBS y colocar el anticuerpo primario e incubar en cámara húmeda, lavar con PBS y colocar el segundo anticuerpo anti-Ig de Ureaplasma e incubar a 37 °C, colocar el conjugado de estreptavidina-peroxidasa e incubar en cámara húmeda a temperatura ambiente, lavar con PBS y adicionar el cromógeno-sustrato amino-9- etil carbazol-peróxido de hidrógeno e incubar, lavar y contrastar con hematoxilina de Harris por último lavar y montar en gelatina, el sitio de reacción antígeno-anticuerpo debe de observarse una coloración roja.

C) REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA PCR

La PCR es un método de diagnóstico rápido y preciso para las infecciones producidas por ureaplasmas. Recientemente su metodología se basa en la amplificación al azar de fragmentos de DNA reorganizados por primers cortos de secuencia arbitraria, para caracterizar las especies de *U. urealyticum*.

- FUNDAMENTO

Es un proceso bioquímico in vitro, mediante el cual las cadenas individuales de DNA blanco son duplicadas por el DNA polimerasa en cada uno de los ciclos (generalmente entre los 20 y 30) que integran la reacción, al final de cada uno de los cuales las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, logrando una producción exponencial de millones de copias del gen o segmento de DNA específico sometido al proceso.

Este proceso fue ideado Karry B. Mullis en 1985, en ese mismo año la PCR fue perfeccionada por otros investigadores y se aplicó exitosamente en el diagnóstico clínico de la anemia de células falciformes.

Los primeros ensayos de la PCR se realizaron en forma manual, utilizando para la amplificación al fragmento Klenow del DNA polimerasa de la bacteria *Escherichia coli*, así como varios baños de agua para las diferentes temperaturas. Más tarde se descubrió al DNA polimerasa termoestable, la Taq polimerasa aislada a partir de la bacteria *Thermus aquaticus*, que habita en aguas termales, y la introducción de termocicladores automatizados, permitieron simplificar la tediosa tarea, haciendo posible la popularización de esta metodología.⁽⁹⁴⁾

Se ha reportado un número diverso de estudios limitados a la aplicación de PCR para la detección de *U. urealyticum* de especímenes clínicos (aspirados traqueales de recién nacidos prematuros) obteniéndose una muy buena sensibilidad en esta técnica, comparado con el empleo de cultivos.^(7, 101)

Los productos relacionados a la detección metodologica de PCR se incluyen los siguientes aspectos: Minimizar y controlar la presencia de componentes inhibitorios en el proceso, estricta precaución de adherencia, minimizando la

contaminación y establecer la relevancia de incremento de sensibilidad en las pruebas en relación a la enfermedad clínica.

En la PCR UM-1 define al fragmento de DNA ascendente de 150 bp. En el gen del antígeno multibandeado del codón principal y una posición de 253 bp. Dentro de la secuencia de codificación del serovar 3 usando estos primers, los 14 serovares de diferentes, más los 20 caracterizados de los aislados invasivos, se tiene el gen del antígeno multibandeado. La cual la PCR UM-1 los organismos de diferentes biovars produce distintos productos de PCR, permitiendo la diferenciación entre estos dos. La PCR se ha documentado la sensibilidad de amplificación de conocer los fragmentos de DNA. El uso del gen de la ureasa y la secuencias de los primers en la detección de *U. urealyticum* de especímenes clínicos se tienen bien reportados.⁽¹⁰²⁾

Recientemente se ha clonado y secuenciado el gen del antígeno multibandeado de la cepa de *U. urealyticum*.⁽¹⁰³⁾ Este antígeno predominantemente es reconocido en pacientes infectados por *U. urealyticum*. El análisis de secuencia de nucleótido del antígeno multibandeado contiene una señal peptido y un sitio en la región N- terminal a la vez que la región C- terminal se compone de un múltiplo de 6 aminoácidos (codificado por 18 nucleótidos), repeticiones, la cual contiene epitopes del serovar- específico. En contraste la región de repetición, en la secuenciación del análisis de PCR de los nucleótidos difiere del antígeno multibandeado del serovar 3 y de las variantes de magnitud sugeridas en la región 5' del serovar 3, los primers empleados para las regiones de *U. urealyticum* son el UMS-125 secuencia (5'-GTA TTT GCA ATC TTT ATA TGT TTT CG-3' Y UMA-226 antisequencia (5'-CAG CTG ATG TAA GTG CAG CAT TAA ATT C -3), estos oligonucleótidos fueron descritos por Ten L. J. et. al.⁽¹⁰¹⁾

- DNA Blanco

La PCR es tan sensible que solo basta una sola molécula de DNA para su amplificación, genes de una sola copia en el genoma pueden ser fácilmente amplificados. La concentración del DNA blanco en la reacción depende de la

fuerza utilizada e idealmente se requieren aproximadamente de 10^5 copias de DNA blanco, esto es de 300 ng a 1 μ g de DNA del genoma humano.

En el caso del uso de genes clonados en plásmido, de 25 a 10 ng. de su DNA son más que suficientes. Alternativamente, cantidades menores de DNA puede emplearse en la amplificación de genes que existen en varias copias en el DNA plantilla. o mayores cantidades cuando se utiliza el mismo par de oligonucleótidos para amplificar varios genes pertenecientes a una misma familia.

- ENZIMA DNA POLIMERASA Taq

Una de las enzimas de DNA polimerasa termoestable empleadas actualmente para la PCR, es el DNA polimerasa taq, debido a su facilidad de estandarización y bajo costo. Esta enzima tiene actividad de DNA polimerasa, de exonucleasa de 5' a 3' su índice de error de incorporación es de 1 en 4×10^4 bases. La polimerasa termoestable de alta fidelidad ha surgido entre las innovaciones enzimáticas recientes tienden a aumentar la fidelidad de la reacción, destaca la introducción de enzimas y fragmentos de DNA polimerasa con menor índice de error de incorporación; por ejemplo el DNA VENT, aislada de la bacteria *Thermococcus litorales*, y el fragmento Stoffel (derivado de la DNA polimerasa taq), esto poseen índices de error bajos de 1×10^{-7} .

Entre las ventajas logradas al utilizar las nuevas DNA polimerasas termoestables fueron el aumento de la fidelidad en la incorporación de nucleótidos y el incremento en la longitud de los segmentos amplificados. En las primeras reacciones los productos no alcanzaban longitudes mayores de 400 nucleótidos, actualmente es posible amplificar productos hasta 10,000 nucleótidos.

- MAGNESIO Y DNTP'S

Es importante considerar la concentración de iones magnesio en la PCR para la especificidad de la reacción. Si hablamos de concentraciones muy altas conducen a una baja especificidad, mientras que las concentraciones mínimas necesarias disminuyen el índice de incorporaciones erróneas de nucleótidos, por lo que se recomienda optimizar la concentración de $MgCl_2$ en cada reacción. Para una

reacción estándar se recomienda utilizar una concentración final entre 0.5 y 2.5 mM. Si se disminuye demasiada concentración de $MgCl_2$ la actividad de la enzima decae al grado de que algunas veces la amplificación es nula. Al igual que el $MgCl_2$, las concentraciones mínimas necesarias de dNTP'S disminuyen el índice de incorporaciones erróneas de nucleótidos, mientras que concentraciones muy altas disminuyen la especificidad de la reacción, por lo que la concentración de dNTP'S debe optimarse. Concentraciones entre 20 y 200 μ M proporcionan resultados óptimos, debiéndose igualar la concentración de cada uno de los cuatro dNTP'S en concentraciones equimolares.

- DNA Ladder 123 bp.

El DNA ladder de 123 bp (U.S. Patent No. 4,403,06) es la de determinar la doble cadena de DNA de 123 a 3075 pares de base. Esta consiste de una serie de fragmentos que corren en gel de agarosa al 1.5 a 2% desde la banda 123 a 4182 pares de bases. Sobre las 25 bandas separadas son visualizadas después del teñimiento con bromuro de etidio.

La electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con buffer de corrimiento Tris-acetato (pH 7.6) el azul de bromofenol migra justo a tras de la banda 492 pb. El azul de bromofenol migra justo atrás de la banda 123 pb con buffer de corrimientode en geles de poliacrilamida al 4% con Tris borato (pH 8.0)

La banda mayor a 246 pb aparesen dobles en geles de poliacrilamida. Debajo de la banda doble es menos intensa que la banda superior.

- CICLOS

Teóricamente se sabe que en condiciones óptimas el nivel de amplificación del DNA en la PCR aumenta en forma exponencial con cada ciclo; sin embargo, en la práctica, después de determinado número de ciclos, la amplificación se detiene gradualmente. Entra primero una fase lineal y luego una estacionaria, denominada fase de "meseta" siendo esta debido al agotamiento de la actividad enzimática y a la insuficiencia para llevar a cabo la extensión del número masivo del complejo DNA blanco-oligonucleótido, presentes en los ciclos que anteceden a este

fenómeno. Esto se evita al aumentar el tiempo de extensión en los últimos ciclos de la reacción o la cantidad de la enzima, aunque es recomendable ajustar el número de ciclos de tal manera que la amplificación se realice al obtenerse niveles máximos de amplificación en una reacción de comportamiento lineal. El número de ciclos promedio oscila entre 20 y 30, dependiendo de la cantidad DNA inicial.

Las temperaturas de desnaturalización (92 a 98 °C) y extensión (70 a 74 °C) son generalmente estándares para todas las reacciones. La temperatura que tiene el efecto más crítico en la especificidad es el alineamiento, la cual está determinada principalmente por la temperatura media de fusión (T_m) de los oligonucleótidos.

- TEMPERATURA DE ALINEAMIENTO

Los oligonucleótidos se aparean a la temperatura de alineamiento por complementariedad al DNA blanco. El alto grado de complementariedad entre las bases nitrogenadas de los oligonucleótidos y del DNA blanco permiten utilizar altas temperaturas de alineamiento que pueden ser menor a la T_m calculada y debe ser estandarizada para permitir el alineamiento de los oligonucleótidos con secuencias de los diferentes genes, pero no deben utilizarse temperaturas de alineamiento demasiado bajas, pues originarían inespecificidad en la amplificación; es decir cuando la temperatura de alineamiento es muy baja existe mayor probabilidad de que los oligonucleótidos se apareen a regiones no específicas del DNA blanco y pueden ser también extendidos, toda vez que la Taq polimerasa posee actividad aún a bajas temperaturas. Utilizando temperaturas de hibridación entre 55 a 65 °C se reducen gradualmente los sucesos de apareamiento inespecífico. Para determinar la temperatura óptima de alineamiento para un par de oligonucleótidos dado que pueden utilizarse varias fórmulas empíricas; una es adicionando 2 °C por cada A y T presentes en el oligonucleótido, y 4 °C por cada G y C y restando 5 °C del resultado.

- PROBLEMAS DE CONTAMINACION

Debido a la alta sensibilidad de la PCR, los problemas de contaminación con DNA diferente al que se requiere analizar, y con productos de amplificaciones anteriores, pueden ocasionar problemas si no se extreman las precauciones del montaje de la reacción. La contaminación por ácidos nucleicos se deben a clonas de plásmidos con los que rutinariamente se trabaja en el laboratorio. Están presentes contaminantes en cantidades relativamente grandes (respecto a las moléculas sustrato para la PCR) en el equipo de materiales y reactivos.

Otra fuente de contaminación en el laboratorio es la acumulación de productos PCR producida por amplificaciones repetidas de la misma secuencia blanco. Esta contaminación es nociva y desafortunadamente es probable que ocurra por el gran número de moléculas que son producidas en una reacción estándar. Cada reacción de PCR pueden contener hasta 10^{12} copias de producto amplificado. Por lo tanto aún la más pequeña gota de aerosol ($10^{-6}\mu\text{l}$) podría contener más de 10^5 blancos potenciales.

Para el montaje de la PCR se debe contar con área especial restringida separada de las áreas donde se extrae el DNA, donde se preparan y dividen las alícuotas de los reactivos, se debe prevenir la presencia de aerosoles y por consiguiente se debe incluir un testigo positivo y negativo, principalmente en las reacciones con fines de diagnóstico.

PROGRESOS

El uso de la enzima DNA polimerasa termoestable Taq permite el desarrollo del termociclador automatizado, dicho de otra manera una máquina programable que permite llevar a cabo la reacción en un solo tubo, en tiempos muy cortos. Estas modificaciones simplifican la metodología e incrementan la especificidad de la reacción.

D) TRATAMIENTO

Actualmente no se tienen registrados estudios relacionados con la eficacia de antibióticos en enfermedades causadas por *U. urealyticum*. En pruebas

realizadas in vitro la eritromicina aparentemente es el antibiótico de preferencia, pero aun no se han tenido resultados contundentes debido a la falta de cepas resistentes de *U. urealyticum* de aislados en neonatos; así mismo la dioxidociclina es usada en las infecciones en líquido cefalorraquídeo.

Reportes recientes confirman la eficacia de eritromicina en neonatos por *U. urealyticum* asociado con enfermedad pulmonar, pero permanece aún en contradicción. En algunos de estos reportes la terapia se inicia después del cultivo positivo para *U. urealyticum*, mientras que en otros la terapia es iniciada después del desarrollo de EPC o DBP.

En el tratamiento para Ureaplasmas no son eficaces los B-lactámicos, ni sulfamidas, sin embargo, son susceptibles a los antibióticos que interfieren en la síntesis de proteínas como tetraciclinas y macrólidos, algunos aminoglicósidos o cloranfenicol. Se ha observado también que el cloranfenicol es un medicamento tóxico para la médula ósea por lo que no es usado en la medicina neonatal. Las tetraciclinas son más conocidas que otras clases de antibióticos con respecto a la susceptibilidad para *U. urealyticum*, resistencia y respuesta al tratamiento.

La mayoría de los estudios in vitro apoyan la selección de la eritromicina como antibiótico de elección para infecciones pediátricas por *U. urealyticum* que no involucran líquido cefalorraquídeo, ya que el uso de eritromicina como antibiótico en neonatos ha recibido poca atención.⁽⁹¹⁾

La administración intravenosa de eritromicina presenta buena presentación en tejido incluyendo pulmón. El tratamiento a tiempo reduce la mortalidad y morbilidad en los neonatos, especialmente en infantes de muy bajo peso al nacer, es por ello la importancia en el diagnóstico oportuno de *U. urealyticum*.^(91, 92)

JUSTIFICACION

Debido a que *U. urealyticum* causa enfermedades severas en los niños recién nacidos como septicemia, meningitis y neumonía: se determinó el papel de infección en los recién nacidos prematuros y a término por lo que se da la búsqueda de una técnica sensible, específica y rápida como la PCR es de gran importancia para el diagnóstico y el tratamiento oportuno.

HIPOTESIS

Ureaplasma urealyticum se identifica con más precisión por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que los medios de cultivo 10B y agar en placa A8.

La frecuencia de *U. urealyticum* identificados por PCR es mayor a la reportada mediante otros medios de identificación en los aspirados traqueales de recién nacidos prematuros de un 15%.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia de colonización de *Ureaplasma urealyticum* en el tracto respiratorio de neonatos prematuros mediante cultivo (caldo 10B y agar en placa A8) y Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR, que se atendieron en el hospital de Ginecología y Obstetricia del Centro Médico Nacional la Raza IMSS.

OBJETIVOS PARTICULARES

-Estandarizar el método microbiológico para medio de transporte, aislamiento e identificación de *Ureaplasma urealyticum*.

-Determinar la frecuencia de aislamiento de *Ureaplasma urealyticum* de aspirados traqueales de neonatos prematuros empleando medios de cultivos especiales para la recuperación de cepas, en caldo 10B y agar diferencial A8.

-Implementar y estandarizar la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), para el diagnóstico clínico para identificar *Ureaplasma urealyticum*.

IV METODOLOGIA

A) DISEÑO EXPERIMENTAL

Observacional, Prospectivo y comparativo.

B) POBLACION:

En el presente estudio se incluyeron 72 (Grupo I) muestras clínicas de aspirados traqueales de recién nacidos prematuros del hospital de Ginecobstetricia del CMN la Raza IMSS y 63 (grupo II) aspirados bronquiales por esputo inducido de recién nacidos a término y 78 (GrupoIII) muestras lactantes ingresados en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS.

C) TIPO DE MUESTRA:

Aspirados traqueales

D) CRITERIOS DE INCLUSION:

Neonatos prematuros con peso al nacimiento (≥ 550 gr.)

Edad de 1 a 7 días

Edad de 24 a 34 semanas de gestación

Intubados

< a 12 hrs. de intubación

*Nota: los criterios antes mencionados no se tomaron en cuenta para los recién nacidos a termino y neonatos lactantes del hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

E) CRITERIOS DE EXCLUSION:

Neonatos prematuros extubados

Neonatos prematuros con alguna otra enfermedad como pulmonar congénita ó cardiaca.

F) VARIABLES:

a) INDEPENDIENTE:

Metodología empleada en la técnica de cultivo y PCR, así como los factores asociados a colonización como son la edad, peso, sexo, edad gestacional, vía de nacimiento y antecedentes de ruptura prematura de membranas.

b) DEPENDIENTE:

Aislamiento de *Ureaplasma urealyticum*.

G) POBLACION DE ESTUDIO

Durante el período de 1997 a 1998, se incluyeron 72 aspirados traqueales de recién nacidos prematuros ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN) del Hospital de Gineco Obstetricia del Centro Medico Nacional la Raza (CMNR IMSS), con peso al nacimiento ≥ 550 g y ≤ 2500 g, edad de 1 a 7 días de haber nacido, edad gestacional de 24 a 34 semanas y \leq de 12 horas de intubación; sólo se excluyeron aquellos neonatos prematuros extubados, con alguna otra enfermedad como pulmonar congénita o cardíaca y con datos clínicos de sospecha de colonización por *U. urealyticum* y otras bacterias relacionadas con enfermedad en el tracto respiratorio. Además se incluyeron 141 aspirados bronquiales, 63 de ellos fueron recién nacidos a término y 78 lactantes in gresados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCIN), de Neumología y Neonatología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, con datos clínicos de sospecha de neumonía y displasia broncopulmonar.

H) COLECTA DE MUESTRAS CLINICAS

Para la obtención de la muestra se introdujo la cánula en el tubo endotraqueal, en el extremo de esta se colocó una jeringa con 1 ml de solución salina isotónica no bacteriostática, posteriormente se le aplicó presión positiva con el objeto de aspirar al final con la misma jeringa.⁽⁹⁵⁾ Los aspirados traqueales fueron tomados dentro de las primeras 12 horas de intubación del recién nacido (0 horas) y a las , 48 horas, 96 horas y 10 días si el niño persistía intubado.

I) TRASPORTE DE LAS MUESTRAS

Debido a que los ureaplasmas son extremadamente susceptibles a las condiciones ambientales adversas especialmente a la sequedad, los cambios osmóticos y a los metabolitos tóxicos, se debe tener especial cuidado y no exponer las muestras a extremas fluctuaciones ambientales. Para esto se agregó 0.1ml de la muestra del aspirado endotraqueal en 900 µl del caldo 10B y 0.2 ml en el medio Stuart para el aislamiento de otras bacterias relacionadas con problemas respiratorios, los medios se mantuvieron a baja temperatura (hielo seco) durante su transporte^(3,15, 96) al laboratorio de la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI (UIMEIP CMNS XXI).

J) PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS EN CULTIVOS

a)-MEDIO STUART

Mediante un isopo estéril se tomó un isopado de muestra del medio Stuart y se inoculó en los medios Gelosa Sangre, Chocolate, agar MacKonkey y Muller Hinton, mediante una asa estéril se estriaron para luego ser incubadas a 37 °C, (Gelosa sangre se incubó a estufa de CO₂), después de 24 horas fueron revisadas para verificar el crecimiento por morfología colonial; y aislar a las bacterias que pudieran estar relacionadas con el agente etiológico en la insuficiencia respiratoria y se identificaron mediante pruebas bioquímicas (TSI; Fenil alanina, Citrato simmons, MIO, Indol, Ornitina, Lisina, Malonato, Urea, Rojo de metilo, Vogues Postkawer) Oxidasa, Catalasa, Coagulasa y frotis para tinción Gram positivas o negativas.

b)-MEDIO CALDO 10B Y AGAR EN PLACA A8

Las muestras clínicas del caldo 10B^(1, 3) (se mezclaron perfectamente y en condiciones de esterilidad se tomaron 400 µl y se alicuotaron en tubos ependorff para guardarlos a -70 °C para su posterior procesamiento para PCR y 100 µl se inocularon en 900 µl del caldo 10B, de este se volvieron a tomar 100 µl y se

volvieron a inocular en 900 μ l en caldo 10B para después realizar una serie de 5 diluciones, posteriormente en placas de agar diferencial A8^(1,3) se dividieron en 6 secciones y se tomaron 20 μ l de cada dilución y se inocularon en cada uno de los cuadrantes correspondientes a cada dilución, se dejó que se reabsorbieran por 5 a 10 minutos a temperatura ambiente y se sellaron con papel parafilm, después se incubaron a 37 °C a condiciones de microaerofilia, en jarra para anaerobiosis, colocando un vaso de precipitado con 20 ml de agua estéril y el caldo 10B se incubó a 37 °C por el mismo tiempo que las placas A8. Después de las 48 horas se revisaron los medios de cultivo caldo 10B, observándose en los positivos el vire del indicador de amarillo a rojo ámbar transparente;(figura 4) en caso de ser turbio el medio, se filtró con membrana de poro 0.45 μ y se tomaron 100 μ l y se inocularon en 900 μ l del medio 10B.

Debido a que existen microorganismos capaces de degradar la urea como algunos estafilococos, proteus y formas L se verificó el desarrollo de colonias de ureaplasmas en el medio A8, con ayuda de un microscopio estereoscópico se observó la morfología colonial característica de *U. urealyticum* que son colonias redondas pleomorfas identificadas por un color café o café oscuro, a iluminación directa (figura 5), esto es debido al metabolismo de la urea en presencia del indicador cloruro de calcio (CaCl₂).⁽³⁾ Se estuvieron vigilando los cultivos durante un periodo de 1 a 14 días, después de este plazo se descartaron los cultivos, este procedimiento se realizó de la misma manera para las muestras clínicas tomadas después de 48, 96 horas y décimo día. En los cultivos donde no hubo cambio de vire del medio 10B, ni desarrollo de colonias en el medio en placa de agar A8 se consideraron como negativos; los cultivos se descartaron después de 15 días.

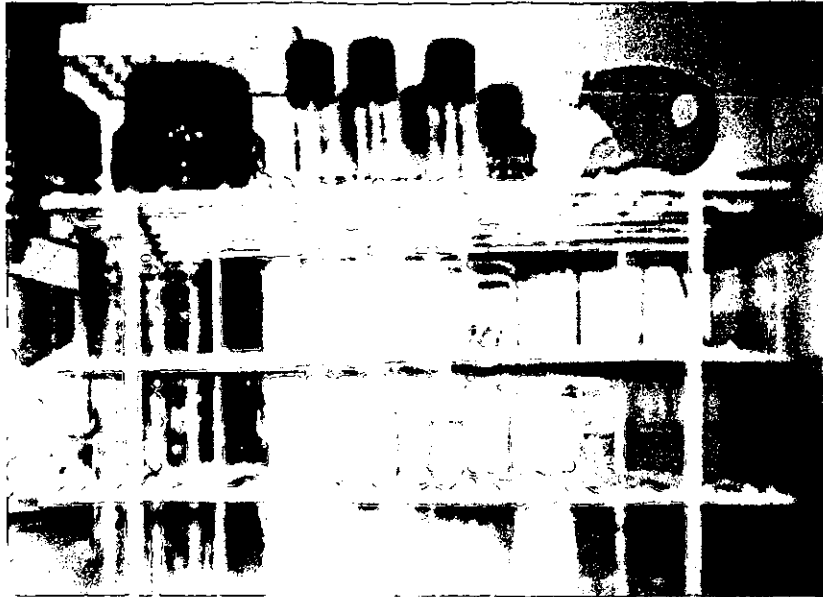


Figura 4. Cultivo de *U. urealyticum* en Caldo 10B, tubo 1 control negativo de color amarillo claro, tubo 2 después de 24 horas de color rojo claro y tubo 3 después de 48 horas de color ámbar de incubación a 37 °C, el cual no se observa ninguna turbidez.

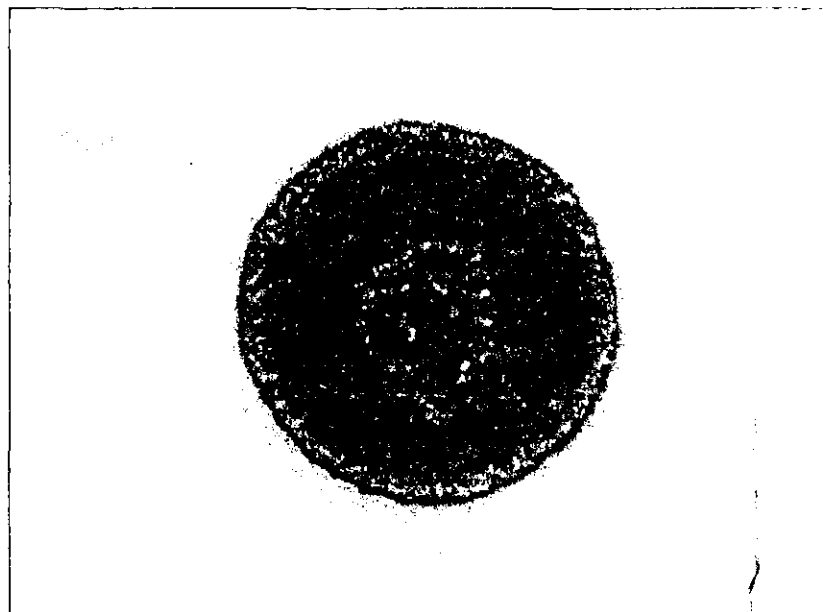


Figura 5. Colonia de *U. urealyticum* en agar en placa A8 observada a microscopia de inmuno fluorescencia a 40X. Forma redonda de color café claro de la colonia embebida en el agar después de 48 horas de incubación en CO₂ a 37 °C.

K) PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA LA TECNICA DE REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

a) EXTRACCION DE DNA.

Para la extracción del DNA se descongelaron las muestras clínicas del medio 10B (400 µl) durante 7 minutos, posteriormente se centrifugaron a 14000 r.p.m. a menos 4 °C durante 30 minutos una vez cumplido el tiempo en condiciones de esterilidad (en campana de flujo) se descartaron los sobrenadantes y se rescataron las pellet o pastillas estas fueron resuspendidas con 100µl de proteinasa K, se incubaron a 57 °C durante 1 hora y 96 °C durante 10 minutos.

a) MEZCLA MAESTRA

Para la realización de la mezcla maestra se trabajó en un área especial restringida, todo el material empleado fue estéril (micropipetas, tubos ependorff, puntas con filtro) antes de llevar acabo la mezcla maestra se puso la campana de flujo a luz ultravioleta (UV) durante 5 minutos con el fin de evitar cualquier contaminación en la reacción, los reactivos de PCR se mantuvieron en hielo durante el procesamiento de la técnica con el fin de evitar cualquier inactivación de los reactivos.

La mezcla maestra incluyó los siguientes reactivos por muestra a un volumen de 45µl

BASE	MUESTRA POR REACCION (VOL. µl)
H ₂ O	28.8
Gelatina	5
Buffer PCR	5
DNTP'S	4
Primer 1	1
Primer 2	1
Taq polimerasa	0.2
Aceite mineral	1 gota

Es importante que los reactivos una vez descongelados a -70 °C se mantengan a hielo debido a que son muy sensibles a temperatura ambiente, se recomienda

que una vez agregada la enzima Taq polimerasa se procese lo más pronto posible debido a que se desnaturaliza a temperatura ambiente.

Fuera del área especial se agregaron 5 µl de las muestras clínicas (DNA extraído), 5 µl del control positivo del sero var 3 y 5 µl del control negativo de agua estéril para un volumen final de 50 µl para la reacción de PCR; después de esto se procesaron en el termociclador durante 35 ciclos.

Cada uno de los ciclos de la reacción consta de tres pasos determinados por temperaturas y tiempos específicos que a continuación se mencionan:

- 1) Desnaturalización (94 °C a 20 segundos), en el cual se van a separar o desnaturalizar las dos cadenas complementarias del DNA.
- 2) Alineamiento (57 °C a 1 minuto), en este proceso se realiza el apareamiento específico entre los iniciadores (oligonucleótidos, UMS-125 y UMA-226) y las cadenas simples del segmento del DNA desnaturalizado.
- 3) Extensión (72 °C a 1 minuto) el DNA polimerasa extiende la longitud de los iniciadores apareados al DNA, al ir polimerizando los desoxinucleótidos libres, resultando en nuevas cadenas complementarias a las dos cadenas sencillas presentes al inicio de la reacción.
- 4) El ciclo siguiente se inicia en el mismo tubo, con los mismos componentes de la mezcla de reacción, pero ahora contienen doble cadena sencilla de DNA que el anterior y finaliza convirtiendo éstas en cadenas dobles.
- 5) Extensión final (72 °C durante 5 minutos); con la sucesión de ciclos se logra una síntesis exponencial del DNA, cuyo tamaño se define desde los primeros ciclos de la reacción, obteniéndose un total de 35 ciclos.
- 6) Mantener a 4 °C

L) CORRIMIENTO DE LOS PRODUCTOS DE PCR EN AGAROSA AL 2 %

Para la preparación de la agarosa al 2% se pesó 1 gr. de agarosa y se disolvió en 50 ml de Buffer TBE de corrimiento 1X a temperatura de ebullición durante 2 minutos, se dejó enfriar durante 7 minutos y se hizo el vaciado en la cámara de electroforésis (previamente ya preparada con el peine y los selladores), se dejó a

gelificar durante 5 minutos y por consiguiente se agregó el buffer de corrimiento de 1X hasta cubrir la placa del gel.

a) PREPARACION DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Se tomaron 20 μ l de las muestras de reacción (muestras clínicas, control positivo, control negativo) y se disolvieron con 5 μ l de colorante de buffer de carga, posteriormente se cargaron 20 μ l de cada una de las muestras, marcador, control positivo y negativo; estas fueron corridas a un voltaje de 140 volts. durante 35 minutos. Por último se teñió con bromuro de etidio en agitación constante durante 10 minutos y se enjuagó con agua destilada para quitar el exceso de bromuro de etidio y se analizó el gel de corrimiento en luz UV.

M) PCR CONTROLES INTERNOS

El objetivo de corrimiento de PCR de muestras clínicas con control interno fue determinar la presencia de inhibidores, para ello se agregaron 5 μ l del control interno a las muestras clínicas y se procedió a realizar la PCR, corrimiento en el gel de los productos y el destiñimiento como ya se mencionó anteriormente, una vez realizado esto se procedió analizar el gel a luz UV las muestras que no amplificaron la banda del control interno se les procedió a realizar la purificación del DNA por considerarse la posible presencia de inhibidores

N) PURIFICACION DEL DNA

Las muestras con buffer de proteínasa K, fueron incubadas a -70°C por 10 minutos y se les adiciono 105 μ l de etanol al 96 - 100%, y se mezclaron, consecutivamente, se les colocó en una columna de colección y se les centrifugó a 8000 r.p.m./por 1 minuto, posteriormente las columnas se colocaron en un tubo limpio de colección de 2 ml y se descartaron los tubos que contenian el filtrado, se les adicionó 500 μ l de buffer AW, y nuevamente se les centrifugo a 8000 rpm/1 minuto, y se descartó el filtrado, colocando las columnas en un tubo limpio de colección de 2 ml, y se volvió a centrifugar a la misma velocidad y tiempo anterior y finalmente en un tiempo de 2 minutos a velocidad total, se colocaron las

columnas en tubos de microcentrifuga y se descartaron los tubos de colección que contenían el filtrado, se abrieron las columnas y se eluyó el DNA con 200 μ l de tris 10 mM a pH 9.0 precalentado a 70 °C por 5 minutos por último se descartaron las columnas de colección y se procedió a realizar nuevamente el proceso de la reacción en cadena de la polimerasa ya antes mencionada.

Ñ) PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

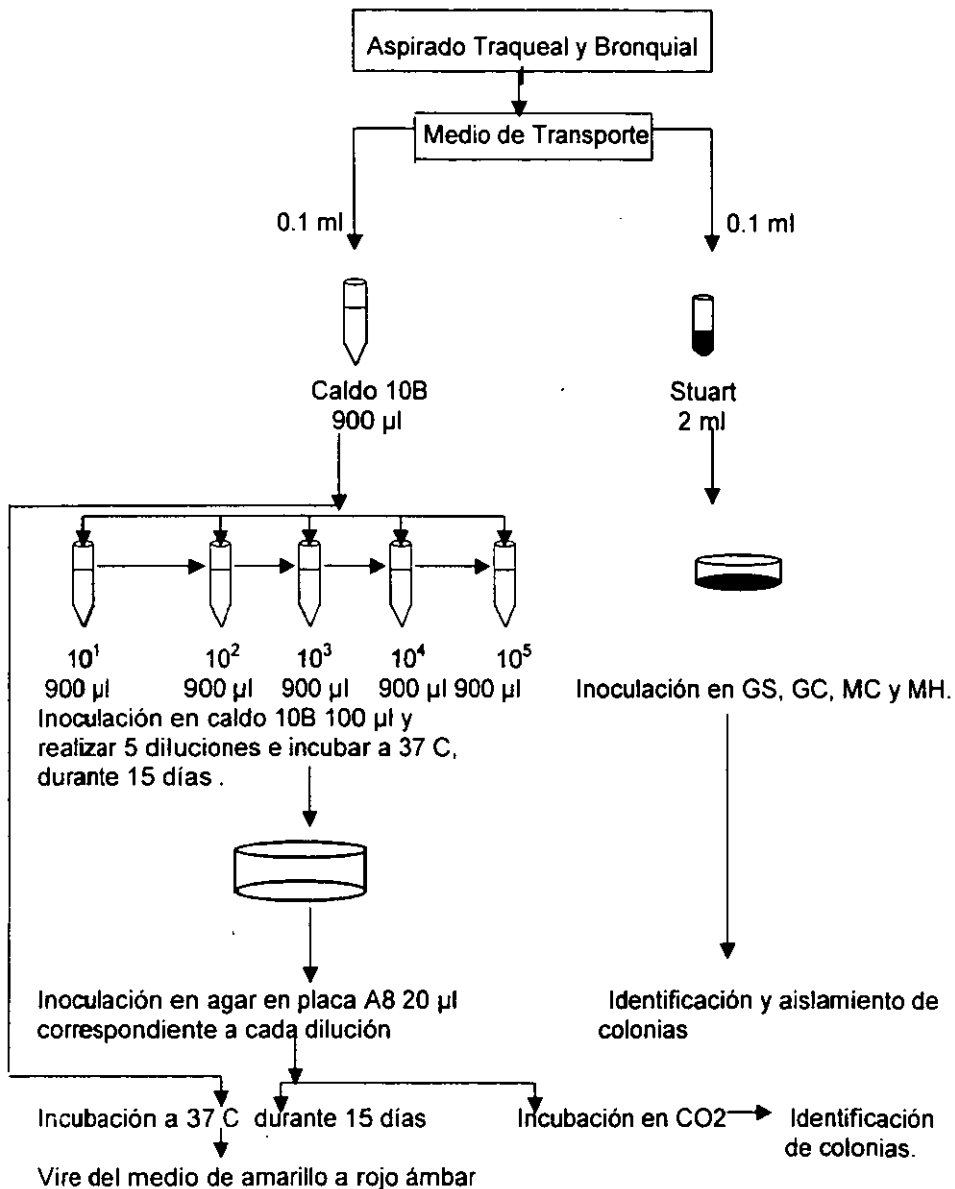


Figura 6. Diagrama del aislamiento de *U. urealyticum* en aspirados traqueobronquiales de recién nacidos pretérmino, a término y lactantes en caldo 10B, agar en placa A8 y Stuart.

N) PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

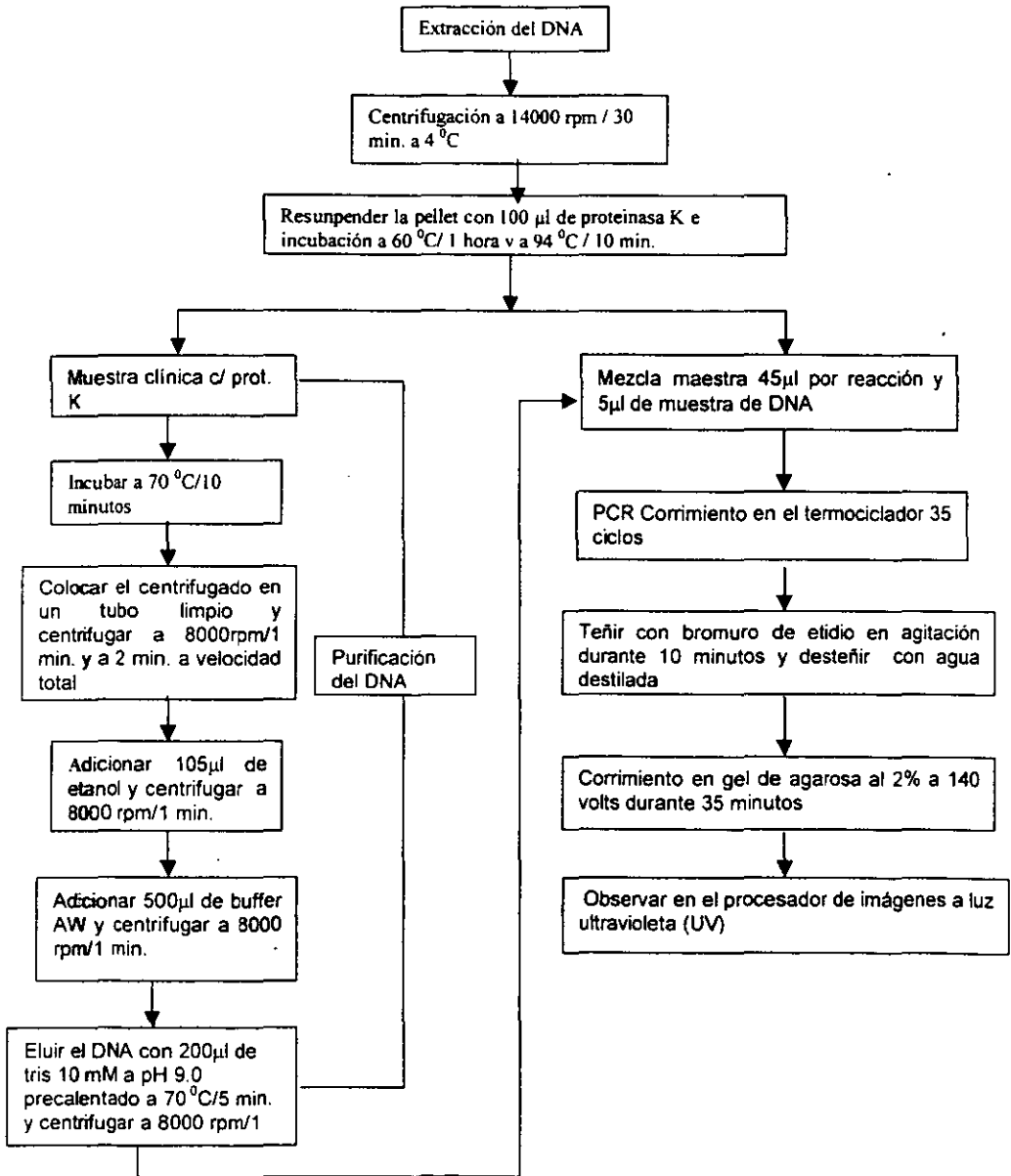


Figura 7 diagrama del procesamiento del DNA las muestras de aspirados traquéales de recién nacidos prematuros para la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

V RESULTADOS

En el presente trabajo se estudiaron tres grupos de pacientes, grupo I Recién nacidos pretérmino, grupo II recién nacido a término y grupo III niños lactantes.

Del total de los 72 casos del grupo I estudiados 29(40.27%), correspondieron al sexo femenino y 16(22.22%) al sexo masculino y 27 sin registros de sexo, detectándose tres casos femeninos y cuatro masculinos colonizados por *U. urealyticum*, sin que se observaran diferencias significativas ($P=0.70$). De los 63 recién nacidos a término, se registraron 24(38%) del sexo femenino y 39(61.90%) del sexo masculino, identificándose 5 casos masculinos y 5 femeninos colonizados por *U. urealyticum*, sin que se observaran diferencias significativas ($P= 0.39$); y de los 78 niños lactantes, 43(55.12%) correspondieron al sexo femenino y 35(44.87%) al sexo masculino, se identificaron 2 pacientes del sexo femenino y uno masculino colonizados por *U. urealyticum* tabla 1.

Con respecto a la edad y peso; en los recién nacidos pretérmino sólo se obtuvo la edad en 41(56,94%) y su peso se registró únicamente en 42(58.3%). En este grupo *U. urealyticum* colonizó a 7 recién nacidos pretérmino que tuvieron una edad promedio de 1.4(1-3) días y un peso promedio de 1228.5(625-2058) gramos; y 38 casos fueron negativos no hubo diferencia significativa tabla 3.

En los recién nacidos a término la edad se obtuvo en los 63 (100%) y sólo se registraron 57 con peso (90.47%); de ellos 10 fueron colonizados por *U. urealyticum* que tuvieron una edad media de 8.21(1-25) días y peso promedio de 2382 (600-3890) gramos y 53 fueron negativos; no se observó diferencia significativa; y de los lactantes, se registraron 78 con edad (100%) y 33 con registro de peso (42.30%) sólo 3 casos fueron colonizados por *U. urealyticum* que tuvieron una edad promedio de 7.5(1-28) meses y peso promedio de 4800(2120-8452) gramos y 75 casos fueron negativos tabla 1.

Con lo referente al método de identificación; de las 72 muestras clínicas de aspirados traqueales de recién nacidos prematuros se identificaron 6(8.33%)

cepas de *U. urealyticum* tanto en caldo 10B como en placa A8, de ellas se detectaron tres cultivos a las 0 horas, dos a las 24 y 48 horas y uno a las 96 horas. Por PCR hubo 7(9.7%) muestras positivas, Tabla 2 y Figura 8.

Otros microorganismos aislados en los 72 cultivos del grupo I (recién nacidos prematuros) se obtuvieron 6(8.3%) *S. epidermidis* y una cepa de *Acinetobacter sp.*, *S. viridans* y *Pseudomona sp.*: *U. urealyticum* y *S. epidermidis* fueron los más frecuentemente aislados, obteniéndose sólo 4 cepas puras y dos asociadas con *S. epidermidis* tabla 3.

En el grupo II de recién nacidos a término; de las 63 muestras clínicas de aspirados bronquiales 10(15.8%) fueron positivas a *U. urealyticum* en caldo 10B, agar A8 y PCR. De los 78 lactantes del grupo III se identificaron 3(3.8%) cultivos positivos a *U. urealyticum* en caldo 10B, agar A8 y PCR positivos figura 8. La frecuencia de otros microorganismos aislados en el grupo de los recién nacidos a término de los 63 cultivos fueron 5(7.9%) cepas de *S. viridans*, 3(4.7%) cepas *S. epidermidis* y *Acinetobacter sp.*, y 2(3.1%) *Candida sp.* y 1(1.5%) *Klebsiella sp.* sólo 9 cepas fueron puras y una asociada a *Klebsiella sp* y a *Candida sp.* En el grupo de los lactantes de los 78 cultivos se aislaron 4(5.1%) cepas de *Pseudomona aeruginosa* ,2(2.5%) cepas de *S. epidermidis* y 1(1.2%) cepa de *Klebsiella sp* , *S. viridans*, *Candida sp*, *Acinetobacter sp* y *Enterobacter cloacae*; sólo dos cepas fueron puras y una asociada a *S. epidermidis*, tabla 3.

En la tabla 4 se muestra el diagnóstico clínico de 10 casos de recién nacidos a término positivos por *U. urealyticum*, 6 de ellos se les diagnosticó neumonía y neumonía atípica entre las edades de 2 a 10 días y peso entre los 900 y 3700 gramos, de los 4 casos restantes un caso presentó sepsis y neumonía (recien nacido a término femenino 11 días y de 1280 gramos, y otro con síndrome colestásico desnutrido (recien nacido a término femenino de 3 días y 930 gramos) e Infección pulmonar en un recién nacido a termino masculino de 8 días y 3755 gramos sólo un caso se registró por neumonía intrahospitalaria en un recién nacido del sexo masculino, de 25 días y peso 3290 gramos. En el caso de los 3 niños lactantes positivos por *U. urealyticum* se registró un caso con neumonía intersticial en un lactante masculino de 3 meses y de 3800 gramos, uno con

atelectasia en lactante femenino de 7 días y 4100 gramos y por último un caso por traqueobronquitis membranosa en un lactante femenino de 28 meses y 6800 gramos.

PCR(RACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA) CORRIMIENTO CON CONTROLES INTERNOS.

El DNA de las 139 muestras clínicas colectadas a las (0, 24 , 48 y 96 Hrs.) se les realizó nuevamente PCR con controles internos en busca de inhibidores de las cuales 87 muestras presentaron inhibidores.

De las 87 muestras clínicas purificadas, dos que habian sido previamente positivas por PCR, después de la purificación se detectó una banda más intensa que la original. (fig. 9).

TABLA 1. Datos demográficos de recién nacidos pretérmino (grupo I), a término (grupo II) y niños lactantes (grupo III) colonizados por *U. urealyticum*

Variables	Grupo I N=72	Grupo II N=63	Grupo III N=78
	<i>U. urealyticum</i> *	<i>U. urealyticum</i> *	<i>U. urealyticum</i> *
	Positivo* /Negativos*	Positivos*/Negativos*	Positivos*/Negativos*
Femenino	3/26 (29) ⁿ	5/19 (24) ⁿ	2/41 (43) ⁿ
Masculino	4/12 (16) ⁿ	5/34 (39) ⁿ	1/34 (35) ⁿ
Edad Promedio	(1.4/2.6) ^D (41) ⁿ	(8.2 /9.5) ^{N,D}	(2.6/7.5) ^{N,M}
Peso g* Promedio	1228.5/1392.7 (42) ⁿ	2382/1748.2 (57) ⁿ	4800/7173.1 (33) ⁿ
Significancia*	N.S		

*Positivos y negativos a *U. urealyticum* por cultivo y PCR

N.S =No significativo

^D= Días

^M= Meses

^N= Número total de casos

ⁿ= Número de casos registrados

Tabla 2. Comparación de las muestras positivas de aspirados traqueales de recién nacidos pretérmino por cultivo (caldo 10B, agar A8) y PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

No.	Cultivos				PCR			
	0 hrs.	24 hrs.	48 hrs.	96 hrs.	0 hrs.	24 hrs.	48 hrs.	96 hrs
1	-	-	-	/	+	-	-	/
2 10B ² / A8 ²	-	/	+	/	-	/	+	/
3 10B ³ / A8 ³	-	+	-	/	-	+	-	/
4 10B ⁴ / A8 ²	+	-	-	/	+	-		/
5 10B ^{2,3} , A8 ²	-	+	+	+	-	+	+	+
6 10B ² , A8 ²	+	-	-	-	+	-	-	-
7 10B ¹ , A8 ¹	+	-	/	/	+	-	/	/

*(1, 2, 3, 4) Indica la dilución a la que creció *U. urealyticum* en caldo 10B y agar A8.

/ No se colectó muestra

Tabla 3 Frecuencia de aislamiento de *U. urealyticum* y otros microorganismos por cultivo en aspirados traqueobronquiales de recién nacidos pretérmino (grupo I), a término (grupo II) y Lactantes (grupo III).

Microorganismos	Grupo I N=72		Grupo II N=63		Grupo III N=78	
	No.	%	No.	%	No.	%
<i>Ureaplasma urealyticum</i> ⁺⁺	6	8.3	10	15.9	3	3.8
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ⁺⁺	6	8.3	3	4.7	2	2.5
<i>Streptococcus viridans</i> ⁺	1	1.3	5	7.9	1	1.2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	1.3	0	0	4	5.1
<i>Acinetobacter sp.</i>	1	1.3	3	4.7	2	2.5
<i>Candida sp.</i> ⁺	0	0	2	3.1	1	1.2
<i>Klebsiella sp.</i>	0	0	1	1.5	1	1.2
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	0	0	1	1.2
Negativos	57	79.1	39	61.9	64	82

⁺⁺ *U. urealyticum* se encontró asociado a *Staphylococcus epidermidis* en dos niños masculinos de edades de 1 día y peso de 925 y 1525 gramos, y un lactante femenino de 6 meses, con peso de 6800 gramos con *Streptococcus viridans*, *Candida sp.*, en un recién nacido a término masculino de 0 días y peso de 1500 gramos.

Tabla 4 Diagnósticos clínicos de 10 recién nacidos a término y 3 lactantes positivos a *U. urealyticum*.

No. de casos	Sexo	Edad	Peso (g)	Diagnóstico
1 [*]	M	2	900	Neumonía atípica
2 [*]	F	3	930	Síndrome colestásico, desnutrido
3 [*]	F	11	1280	Sepsis, neumonía
4 [*]	F	4	1320	Neumonía crónica
5 [*]	M	11	1500	Neumonía
6 [*]	F	10	3050	Neumonía atípica
7 [*]	M	25	3290	Neumonía intrahospitalaria
8 [*]	F	10	3700	Neumonía atípica
9 [*]	M	8	3700	Neumonía
10 [*]	M	8	3755	Infección pulmonar
1 [*]	M	3	3800	Neumonía intersticial
2 [*]	F	7	4100	Atelactasia
3 [*]	F	28	6800	Traqueobronquitis membranosa

^{*}Recién nacidos a término

*Niños lactantes

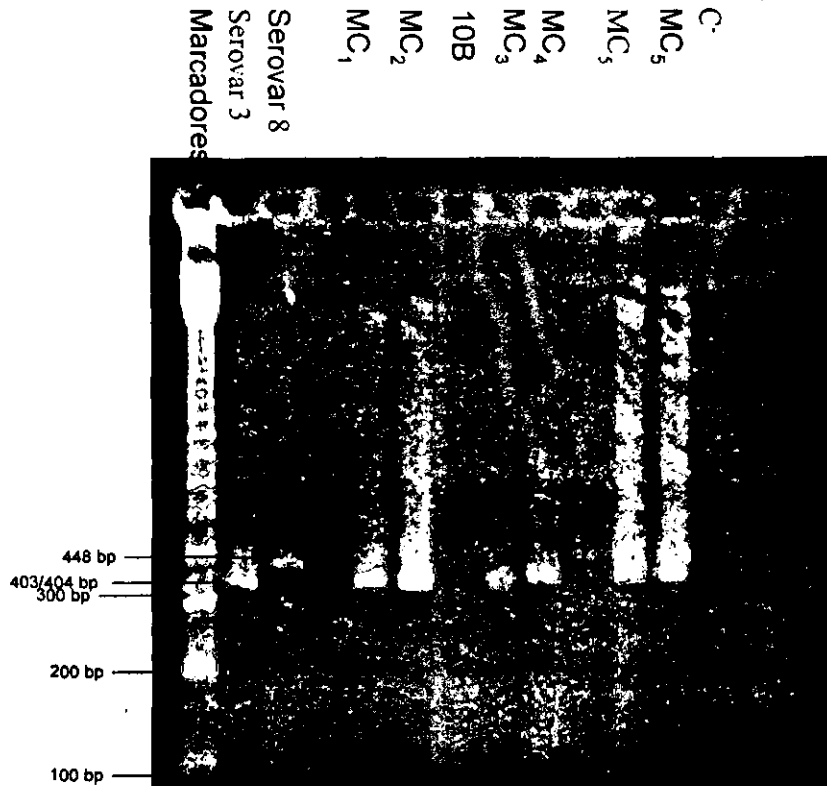


Figura 8. Productos de PCR, en electroforesis en gel de agarosa al 2 %, línea 1 Marcador de peso molecular (123 bp ladder), amplificaciones con primer UMS-125 y UMA 226 de peso molecular de 403/404 bp. bandas en las líneas 2 y 3 serovar 3 y 8 de *U. urealyticum*, líneas 5, 6, y 8 muestras clínicas obtenidas de aspirados traqueales de recién nacidos prematuros, 9, 11, 12 muestras clínicas de aspirados bronquiales, línea 7 10B agua y línea 13 control negativo.

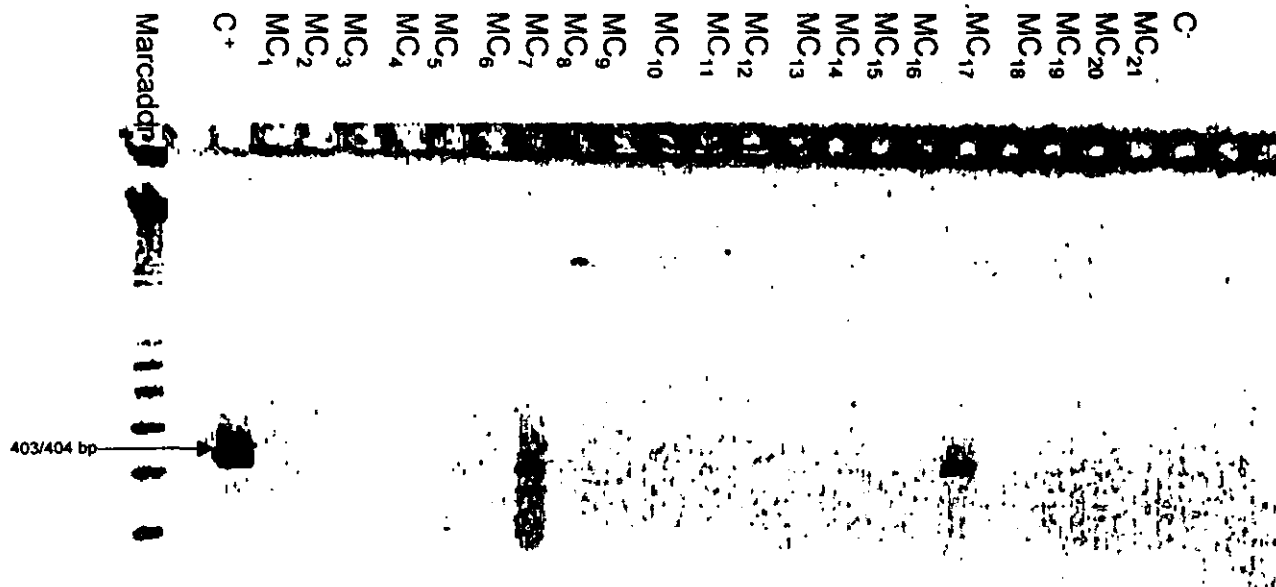


Figura 9. Productos de PCR, análisis de electroforesis en gel de agarosa al 2 %, DNA purificado, línea 1 Marcador de peso molecular 123 bp. ladder, amplificación con primer UMS-125 y UMA226 línea 3 control positivo (serovar 3 de *U. urealyticum*), líneas 3 a la 24 muestras clínicas de aspirados traqueales de recién nacidos prematuros y línea 25 control negativo; la única amplificación después de la purificación se observa en la línea 26 con peso molecular de 123 bp.

VI DISCUSION

Actualmente *U. urealyticum* es considerado como un agente comensal del tracto genital de mujeres sexualmente activas, por lo que se ha reportado la colonización entre un 40 a un 80 %.⁽²⁾ En previos estudios se reporta un 15% de colonización en aspirados traquéales de recién nacidos prematuros, dando el incremento de enfermedades respiratorias.

Es por ello el uso de medios de cultivo de cultivo (10B, agar A8 y una prueba de sensibilidad como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).⁽⁷⁾

En nuestro trabajo, de los 48 (62.5%) casos de los 72 recién nacidos prematuros (Grupo I) se encontraron 7 casos colonizados por *U. urealyticum*, tres femeninos y 4 masculinos; con una edad promedio de 1.4(1-3) días y peso promedio de 1228.5 (625-2058) gramos y 38 casos fueron negativos, sin que se observaran diferencias significativas (tabla 1). La colonización por este microorganismo, se observó en el primer día de nacimiento con peso mayor a 850 gramos y menor a 1500 gramos. Probablemente no hubo diferencia significativa, debido a que el tamaño de muestra fue pequeño.

Nuestros resultados se asemejan con la colonización de *U. urealyticum* en los recién nacidos pretérmino de edad temprana y peso bajo al nacimiento reportado por la Dra. Cassell ^(22, 37) quién ha reportado en diversos trabajos evaluando a niños prematuros con peso menor a 1500 g son más susceptibles a ser colonizados y presentar enfermedades respiratorias como la Displacia Broncopulmonar.

Se ha reportado que ocasionalmente los ureaplasmas causan enfermedades respiratorias en recién nacidos. Estas infecciones son frecuentemente adquiridas en útero, pero el papel de estos organismos, están asociados con la vía vaginal; sin embargo, los ureaplasmas al parecer están implicados en las enfermedades respiratorias en infantes de muy bajo peso al nacimiento <1000 g a quienes se les

ha aislado ureaplasmas desde los aspirados traquéales en las primeras 24 horas de vida. ⁽⁷⁾ La asociación entre *U. urealyticum* en la colonización de infantes y el desarrollo de EPC se tiene documentada, pero la causa-efecto no ha sido totalmente confirmada. ⁽⁹⁾ (9).

También se ha asociado a estos organismos en la tráquea de los infantes con peso <1000 g con el incremento de insuficiencia respiratoria en la enfermedad pulmonar crónica (EPC), el papel que juegan estos organismos en la enfermedad pulmonar crónica (EPC) en los infantes prematuros, aun no se describe con certeza. ^(1, 3, 4)

En otro estudio se reportó en 3 infantes la colonización inicial por *U. urealyticum* ocurrió en la segunda semana y en un infante en la cuarta semana de edad, de estos infantes se tiene un peso al nacimiento de 1420g.

En el caso de los recién nacidos a término (Grupo II) de los 63 casos de recién nacidos a término se identificaron 5 casos femeninos y 5 casos masculinos colonizados por *U. urealyticum* entre la edad promedio de 8.21(1-5) días y peso promedio de 2382(600-3840) gramos y 53 casos fueron negativos; no se observaron diferencias significativas. De estos se identificaron cuatro casos con diagnóstico clínico (de 2 días con neumonía atípica, de 4 días con neumonía crónica, de 3 días con neumonía y uno de un día con probable neumonía atípica) y cinco casos de 11 días con Sepsis, neumonía y sólo se identificó un caso a los 25 días, con neumonía intrahospitalaria; en los 78 lactantes (Grupo III) sólo se identificaron dos casos femeninos y uno masculino colonizados por *U. urealyticum* entre la edad promedio de 7.5 (1-28) meses y peso de 4800(2120-8452) gramos y 75 casos fueron negativos (tabla 1). De estos, un caso de tres meses de edad presentó neumonía intersticial, otro caso de 7 meses de edad presentó Traqueobronquitis Membranosa, el último casos presento SDR, Displacia Broncopulmonar tabla 4. El porcentaje de colonización en estos dos grupos fue bajo comparado con estudios realizados en infantes de término, donde la transmisión vertical por *U. urealyticum* es de una proporción del 45% a 66%, como lo reportado por Pablo y colaboradores. ⁽¹⁰⁵⁾ En otro estudio realizado ⁽³⁶⁾ se encontró que 38 de 108(35.2%) infantes de término la colonización se dio a través

del tracto genital (vagina o placenta) de la madre; detectando 10 en vagina y 16 por placenta y 12 en ambos, la sensibilidad de muestras de placenta de *U. urealyticum* fue de 28 de 38(73.7%), comparado con 22 de 38(57.9%) de muestra vaginal.

En otro reporte ⁽⁶²⁾ se examinó el tejido fetal de infantes de nacimientos muertos y se observó una inflamación aguda en cultivos positivos por *U. urealyticum*. También se reportó un caso de neumonía neonatal por Ureaplasma. ⁽⁶⁾ En este estudio se describió un infante con peso de 2750 g con Sepsis aguda y neumonía quién murió a la edad de 3 días; la autopsia reveló en un exudado células irregulares polimorfonucleares, aumento de macrófagos vacuolares dentro de los ductos alveolares, alvéolos, bronquiolos terminales y respiratorio; el único organismo aislado fue *U. urealyticum*, la frecuencia no específica de lesión patológica se tiene atribuido a este organismo en la infección en humanos.

En resultados obtenidos se observa una mayor frecuencia de aislamiento de *U. urealyticum* en aquellos niños recién nacidos durante el primer día de vida extrauterina (0-1 día) y peso de 825 a 1300g. Estos resultados pueden ser más satisfactorios en estudios a futuro, si se tratan de evaluar poblaciones con factores como la edad y el peso, con un número mayor de muestras.

Con respecto al cultivo y la PCR en el grupo I la frecuencia de aislamiento de *U. urealyticum* fue del 8.3% por cultivo (observando en tres casos positivos a las 0 horas donde el desarrollo de *U. urealyticum* en caldo 10B fue hasta la 4 dilución y en agar en placa A8 fue hasta la segunda dilución, un caso a las 24 horas y otro caso a las 48 horas, *U. urealyticum* creció a la tercera dilución en caldo 10B y segunda dilución en agar A8 y sólo en un caso fue positivo a las 24, 48 y 96 horas tabla 2) y por PCR 7(9.7%) figura 8. De acuerdo a nuestro estudio los datos encontrados fueron bajos comparados con los datos reportados en Estados Unidos de Norte de América donde la frecuencia de aislamiento por cultivo y PCR varía de 14% a 17%, ⁽³⁾ y por otros estudios realizados por Ollikainen, donde reporta un 46% de aislamientos de *U. urealyticum* de aspirados bronquiales de recién nacidos prematuros empleando caldo y agar A7 y por Blanchard y colb, de 95 muestras colectadas de aspirados endotraqueales encontraron 12 muestras

positivas por cultivo y 11 positivas por PCR. ⁽⁹⁾ A diferencia de las 63 muestras clínicas de aspirados bronquiales de recién nacidos a término comparado con el grupo I; el aislamiento de *U. urealyticum* fue mayor; se identificaron 10 cepas positivas por cultivo y PCR que corresponde al 15.87% y de los 78 lactantes, sólo se identificaron 3(3.84%) cepas positivas por cultivo y PCR figura 8 considerando estos valores aproximados al estudio realizado en México por la Dra. Castillo que incluyó a niños recién nacidos hasta 12 meses de edad, encontrando una frecuencia de aislamiento del 11% y tomando en cuenta al grupo de neonatos se encontró un aislamiento del 13% realizando el diagnóstico por cultivo (101) y por el estudio realizado por Jonsson et al encontraron 29/155(19%) cultivos positivos a *U. urealyticum* y 11 cultivos positivos de secreción endotraqueal y nasofaringe. ⁽⁹⁵⁾

En otro estudio realizado por Albert G. Pedroza y col, encontraron que de los 220 casos estudiados se identificaron 164(74.5%) con cultivo. ⁽⁶⁾

Los posibles factores que influyeron para un menor aislamiento en nuestro estudio fueron: la forma de la toma de la muestra en los aspirados; ya que durante un periodo de 10 meses, no se recolectaron muestras clínicas debido a que hubo periodos vacacionales del personal, y por los nacimientos de niños pre-diabéticos con peso mayores a los 5500 g, además del desarrollo de otros microorganismos en el medio caldo 10B que pudieron inhibir el crecimiento de *U. urealyticum* por la competencia de nutrientes.

En los recién nacidos pretérmino se encontró que *U. urealyticum* y *Staphylococcus epidermidis* fueron aislados en igual proporción, dos cepas se recuperaron puras y dos cepas se asociaron con *S. epidermidis*, 2.7% y *Acinetobacter sp.*, *S. Viridans*, *Pseudomona sp* en 1% como se observa en la tabla 3. En comparación, en los recién nacidos a término (N=63) la recuperación de cepas fue mayor identificando 10 cepas de *U. urealyticum*, 9 cepas puras y una asociadas a *Klebsiella sp.* y a *Candida sp* y de manera consecutiva se aislaron a *S. viridans*, *S. epidermidis*, y *Acinetobacter sp*, mientras que en el grupo de los lactantes se aislaron 4 cepas de *Pseudomona aeruginosa*, 2 de *S. epidermidis* y consecutivamente a *Klebsiella sp*, *S. viridans*, *Candida sp*,

Acinetobacter sp y *Enterobacter cloacae*, sólo dos cepas de *U. urealyticum* fueron puras y una asociada a *S. epidermidis*, tabla 3.

U. urealyticum a diferencia de otros microorganismos, puede colonizar el producto desde el útero materno o durante el nacimiento en el canal del parto, a diferencia de los microorganismos anteriores que pueden colonizar al recién nacido al momento del nacimiento o por el ambiente intra hospitalario como en el caso de las *Pseudomonas sp*, y *Acinetobacter sp.*, fue por debajo del 1%. Por lo tanto la asociación que tuvo *U. urealyticum* con otros microorganismos al estar implicado con la enfermedad respiratoria en el recién nacido pretérmino, la frecuencia obtenida en este trabajo fue también baja menor al 3% y se encontró en asociación con *S. epidermidis*.

En comparación de los recién nacidos a término y lactantes la frecuencia fue baja encontrando una asociación con *S. viridans*, *Candida sp.* recién nacido a término masculino de 0 días y peso de 1500g. Un estudio realizado por Ollikainen y cols, ⁽⁹⁹⁾ reportaron una frecuencia del 13% de *U. urealyticum* asociado a otras bacterias. En otro estudio *U. urealyticum* no estuvo asociado en un 28% y *S. epidermidis* fue el segundo microorganismo más aislado. Sin embargo el porcentaje tan alto que obtuvieron con respecto al aislamiento de *U. urealyticum* se atribuye a la alta tasa de colonización materna. Nuestros resultados mostraron un mayor aislamiento de *U. urealyticum* para los recién nacidos a término y lactantes, estos no se asemejan con los reportados previamente, por lo que se sugiere estudiar una muestra mayor para corroborar estos resultados. Roberto et. al, identificaron la presencia de cultivos positivos de microorganismos en el líquido amniótico, fue del 51.5% (17/33). El microorganismo más común fue *U. urealyticum* (n=6) *Gardherella vaginalis* (n=3), *Fusodacterum sp.* (n=3) *Mycoplasma hominis* (n=2) y *Candida albicans* (n=2). En otro estudio realizado por Hazan et. al, encontraron la presencia de cultivos positivos, fue del 32.2% (29/90), siendo *U. urealyticum* el más comúnmente aislado. ⁽⁸⁾

Con referencia a la purificación del DNA; de las 139 muestras clínicas (aspirados traquéales de recién nacidos prematuros) se observó que 52 no presentaron inhibidores y 87 presentaron inhibidores, de estos al purificarlas se detectaron en

dos muestras que habían sido previamente positivas, dos bandas más intensas que la original y en una muestra que fue negativa por cultivo y PCR positiva, continuó siendo PCR negativa después de la purificación figura 9, esto significa que probablemente, ciertas variables como, la poca cantidad del DNA, la presencia del exceso de inhibidores, y el mal procesamiento de la muestra pudieron influir en estos resultados, dado a que la PCR es una técnica muy sensible, es por ello que se requiere de mucha experiencia en el procesamiento de esta técnica.

En dos reportes de amplificación de PCR en los genes de ureasa para detectar *U. urealyticum* de aspirados endotraqueales de neonatos (Scheurlen et. al.), detectaron una cepa de *U. urealyticum* de 36 muestras Blanchard et. al, quienes examinaron 95 muestras por cultivo y PCR. La única muestra en el estudio por Blanchard et. al, la cual fue positiva por cultivo y negativo por PCR, mostrando en la de los recién nacidos prematuros y a término muestra un número pequeño de organismos.

Es por ello que *U. urealyticum* se considera como un organismo patógeno importante que se encuentra implicado en enfermedades en los recién nacidos pretérmino como las del aparato respiratorio, así de esta manera se requiere del uso adecuado de los medios selectivos como 10B, A8 y la PCR en el diagnóstico para un tratamiento oportuno, y así disminuir la tasa de morbilidad y mortalidad.

Estos resultados dan lugar a la investigación con respecto al papel de *U. urealyticum* como patógeno en los recién nacidos pretérmino a término y lactantes.

VII CONCLUSIONES

La frecuencia de aislamiento de *U. Urealyticum* en los niños recién nacidos prematuros por cultivo fue del 8.3% y PCR 9.7%, en recién nacidos a término fue del 14.4% y lactantes fue el 3.8% por cultivo y PCR.

Otros microorganismos asociados con *U. Urealyticum* en los recién nacidos prematuros se identificó a *S. epidermidis*, en recién nacidos a término se encontró asociado con *S. epidermidis* y *S. viridans* y en los lactantes a *Candida sp.*

El sexo peso y la edad de los recién nacidos prematuros y a término no estuvieron asociados a la colonización por *U. urealyticum*.

U. urealyticum se aisló en un mayor número de casos (9.7%) en los primeros tres días de vida en los recién nacidos prematuros y el 15.87% en los primeros 25 días de edad en los recién nacidos a término no hubo diferencias significativas y el 3.84% en los primeros 8 meses de edad en los lactantes.

La purificación del DNA es un método útil para cuando existan inhibidores en las muestras clínicas.

***Sugerencias**

*Por su importancia clínica patógena se prosiga su estudio para fines de morbilidad y mortalidad.

*Proseguir con métodos moleculares más eficaces para su identificación como Southern blot.

*Implementar estudios sobre mecanismos de patogenicidad.

*Seguir con el estudio en poblaciones de cohorte más grandes.

VIII APENDICE

1) MATERIAL

A) EQUIPO

- ❖ Pipetas de 0.1-10 ml
- ❖ Tubos con tapón de rosca 13 X 100 mm
- ❖ Frasco color ámbar
- ❖ Tubos épendorff de 1-2 ml y de PCR 0.5 ml
- ❖ Jarra para sistema Gas Pak BBL
- ❖ Cajas petri
- ❖ Pipetas Pasteur
- ❖ Jeringas de 5-10 ml
- ❖ Vasos de precipitados de 10, 20, 50, 100, 250, 500 y 1000 ml
- ❖ Portafiltros
- ❖ Membranas con poro de 0.22 y 0.45 μ
- ❖ Frascos Durán de 100, 250 y 500 ml
- ❖ Micropipetas de 10, 20, 100, 200, 1000 μ l
- ❖ Puntas con y sin filtro para micropipetas
- ❖ Gradilla
- ❖ Mechero
- ❖ Bulbo
- ❖ Vela
- ❖ Gasas
- ❖ Bolsas de papel para esterilizar
- ❖ Cinta testigo
- ❖ Papel craft
- ❖ Papel aluminio
- ❖ Porta y cubreobjetos
- ❖ Puente para tinción de gram

- ❖ Parafilm
- ❖ QIA amp Blood Kit (Buffer AW, etanol 100%)
- ❖ 250 QIA amp spin columns
- ❖ 750 colección tubes (2ml)

B) APARATOS

- ❖ Estufa Bacteriológica a 37 °C (Precisión economy incubator)
- ❖ Campana de flujo laminar Nuair Biological Safety Cabinets (Class II Type A/B3)
- ❖ Potenciómetro (Denver Instrument)
- ❖ Balanza analítica (Denver Instrument M-220)
- ❖ Balanza granataria (Denver Instrument XE –3100 D)
- ❖ Micro centrifuga refrigerada
- ❖ Refrigeradores –20 °C (Toro-Key) y –70 a –82 °C (Revco) y 4 °C (Toro-Key)
- ❖ Microscopio óptico (Olympus CK40, Mo21) y estereoscópico
- ❖ Termociclador (Amplitrón II Thermoline)
- ❖ Fuente de poder (Bio-Rad Power Pac 300)
- ❖ Cámara de electroforesis (Horizon 58 Life Technologies Gibbco BRL)
- ❖ Agitador (Solbat RPM 180)
- ❖ Procesador de imágenes (Gel Doc 2000 Bio-Rad)
- ❖ Incubador Nes Lab –30°C a +100 °C
- ❖ Parrilla Sybron/ThermoLyne Type 1000 Stir Plate

2) MEDIOS DE CULTIVOS Y SUPLEMENTOS

- ❖ Gelosa sangre
- ❖ Gelosa chocolate
- ❖ Agar MacConkey Bioxon 450 g
- ❖ Agar Müller Hinton
- ❖ Agar exento de inhibidores DIBICO 400 g
- ❖ BBL Base para Mycoplasmas Becton Dickinson 500 g
- ❖ DNA (ácido deoxiribunucleico) sigma 25 g
- ❖ Suero fetal de bovino Hyclone 500 ml
- ❖ Suero de caballo desgammaglobulinizado Hyclone 500 ml

- ❖ Isovitalax (enriquecimiento GC) erlic^{MR} base y diluyente 10 ml
- ❖ Extracto de levadura Difco 500 g
- ❖ Caldo de soya tripticaseína Difco 500 g (Soybean-casein Digest Medium)

A) MATERIAL BIOLÓGICO

- ❖ Cepa de referencia de *U. urealyticum* serovar 3 (1 ml)
- ❖ 100µl de aspirado bronquial de neonatos prematuros, en solución salina isotónica

B) REACTIVO

- ❖ Putresine sigma (Tetramethylenediamine Dihydrochloride C₄H₁₂N₂·HCl)
- ❖ Cloruro de Calcio (CaCl₂)
- ❖ Urea H₂NCONH₂ Sigma 1 K (10%)
- ❖ Rojo de fenol al 1%
- ❖ L-cisteína GH₇NO₂S Sigma 1 K (4% y 10%)
- ❖ Acido clorhídrico 1N
- ❖ Hidróxido de sodio 1N
- ❖ Antibióticos anfotericina B o cefoperazona (cefobid)
- ❖ Alcohol absoluto
- ❖ Reactivos para tinción de gram (cristal violeta, lugol, alcohol cetona y safranina)
- ❖ GHL-Tripeptido Gly-His-Lys Sigma 10 mg (G-1887 acetate salt)
- ❖ Carbón activado 500 g (Sigma)
- ❖ Bromuro de Etidio 10 ml (10 mg/ml) Gibco BRL

C) REACTIVOS PARA LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

- ❖ Gelatina Gelatin Type A: From porcine skin 200 g
- ❖ Buffer PCR 17.5 mM MgCl₂
- ❖ DNTP'S (Gibco BRL)
- ❖ Primer o iniciador UMS-125
- ❖ Primer o iniciador UMA-226
- ❖ Taq polimerasa (Gibco BRL)
- ❖ Buffer de corrimiento 10X y 1X
- ❖ Agarosa al 2%

- ❖ Proteínasa K
- ❖ Etanol 96-100%
- ❖ Buffer Aw
- ❖ Tris 10 mM pH=9.0
- ❖ Tris base
- ❖ Acido bórico
- ❖ EDTA 0.5 M
- ❖ Tris/HCl
- ❖ KCl
- ❖ MgCl₂
- ❖ Aceite mineral, Fabriven

D) MEDIO STUART

Se conforma de una solución amortiguadora (soluciones estabilizadoras de pH). Este medio tiene como fundamento el de preservar la viabilidad de las bacterias durante el transporte sin que exista una multiplicación de microorganismos. El tioglicolato de sodio se añade como agente reductor para mejorar la recuperación de bacterias anaerobias, la pequeña cantidad de agar provee una consistencia semisólida para impedir la oxigenación durante el transporte.

▪ COMPOSICION

• Tioglicolato de sodio	1.0 g
• Glicerofosfato de sodio	10 g
• Cloruro de calcio	0.01 g
• Azul de metileno	0.002 g
• Agar	3.0 g
• Agua desmineralizada	1.0 g

▪ PREPARACION

- Pesar 14.1g de polvo
- Disolver en 1litro de agua desionizada

- Hervir con mechero agitando constantemente durante 1 minuto
- Vaciar 7ml. de medio en tubos de 13 X 100mm
- Esterilizar por 15 min. a 121 °C

E) MEDIO 10B

Se conforma de urea al 10% para que *Ureaplasma urealyticum* metabolice y produzca amonio incrementando el pH, originando el cambio de color en el medio de amarillo a rojo ámbar (ácido a básico), por el indicador rojo de fenol.

COMPOSICION

- BASE para 1 L
- Caldo base para mycoplasma 14 g
- DNA (sigma) 0.2 g
- Agua destilada 800 ml.
- Rojo de fenol (1%) 0.1 ml.
- Ajustar a pH 5.5
- Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos, dejar enfriar durante 1 hora
- Suplementos: realizar en condiciones de esterilidad (campana de flujo)
- Suero fetal de bovino inactivado a 56 °C a 30 minutos 200 ml
- y filtrado con membranas de 0.22 μ
- Cisteina al 4% (filtrado con membranas de 0.22μ) 2.5 ml
- Isovitalex 5.0 ml
- Urea ultrapura al 10% 4.0 ml
- Cefobid 250 μl
- pH final de 6.0 a 6.1
- Alicuotar 900μl en tubos ependorff estériles de 1 ml
- Realizar el control de calidad. la fecha de caducidad es de 3 meses a 4 °C

F) MEDIO DE CULTIVO AGAR A8

Es un medio diferencial para el aislamiento de *U. Urealyticum* del cual se conforma de los siguientes componentes:

▪ **COMPOSICION**

- | | |
|--|----------|
| • BASE | Para 1 L |
| • -Caldo base para mycoplasma | 14 g |
| • -DNA (sigma) | 0.2 g |
| • Calcio clorhidrico (CaCl ₂) | 0.15 g |
| • Extracto de levadura | 2.0 g |
| • Putresina | 1.7 g |
| • Agua destilada | 825 ml |
| • Caldo de soya tripticaseina | 2.4 g. |
| • Ajustar a pH 5.5 | |
| • Adicionar el agar exento de inhibidores | 10.5 g. |
| • Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos dejar enfriar durante 1 hora | |
| • Suplemento: en condiciones de esterilidad | |
| • Suero de caballo inactivado a 56 °C a 30 minutos | 200 ml |
| • Filtrado con membranas de 0.22 μ | |
| • Cisteína al 10% (filtrado con membranas de 0.22μ) | 2.5 ml |
| • Isovitalé | 5.0 ml |
| • Tripeptido GHL | 1.0 ml |
| • Urea ultrapura al 10 | 4.0 ml |
| • Cefobid 0.2 g | |
| • Distribuirlos en cajas petri sellarlas con parafilm, su caducidad es de 3 meses a 4 °C | |

G) AGAR MaConkey (Bioxon)

- | | |
|-----------------------------------|----------|
| ▪ Para un litro de agua destilada | |
| ▪ Composición | Peso (g) |
| • Peptona de caseína | 1.5 |
| • Peptona de gelatina | 17.0 |

- Peptona de carne 1.5
- Lactos 10.0
- Sales biliares 1.5
- Cloruro de sodio 5.0
- Agar 13.5
- Rojo neutro 0.03
- Cristal violeta 0.001

•PREPARACION:

- Resuspender 50g del medio deshidratado en un litro de agua destilada
- Mezclar bien hasta obtener una suspensión uniforme
- Dejar reposar durante 10 a 15 minutos
- Calentar suavemente agitando frecuentemente y hervir un minuto
- Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos
- Vaceado del medio en cajas petri

H) AGAR MULLER-HINTON (Bioxon)

- Par un litro de agua destilada
- Base Peso (g)
- Infusión de carne de res 300
- Peptona de caseína h 17
- Almidó 1.5
- Agar 17

• PH final \pm 7.4

▪ PREPARACION:

- Resuspender 38g del polvo en un litro de agua destilada
- Mezclar bien calentando y agitando constantemente
- Hervir durante un minuto
- Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos
- Vaceado en cajas petri

I) GELOSA SANGRE

- Para 1lt de agua destilada
- Base Peso (g)
- Extracto de levadura 5.0
- Infusión de músculo cardíaco 2.0
- Peptona de caseína 13
- Cloruro de sodio 5.0
- Agar 15
- Ajustar a pH 7.3 ± 0.2

•PREPARACION:

- Resuspender 40g del polvo en un litro de agua destilada
- Mezclar perfectamente, calentar con agitación constante
- Hervir durante un minuto hasta disolverlo completamente
- Esterilizar a 121°C por 15 minutos
- Enfriar la base a 45°C y adicionar 5% de sangre desfibrinada
- Adicionar el antibiótico en caso dado ampicilina frecuentemente reconstituida en solución salina isotónica estéril
- Vaciado en cajas petri

J) GELOSA CHOCOLATE (Bioxon)

- Para 1lt de agua destilada
- Base Peso (g)
- Peptona de caseína 7.5
- Almidón de maiz 1.0
- Peptona de carne 1.5
- Fosfato dipotásico 4.0
- Fosfato monopotásico 1.0
- Agar 10
- Hemoglobina (Bioxon) 10
- Ajustar a pH 7.2 ± 0.2

- **PREPARACION:**
- Resuspender 10g de la base de hemoglobina en 500ml de agua destilada
- En otro matraz disolver 30g de la base del agar gelosa chocolate en 500ml de agua destilada, agitar bien y dejar reposar durante 10 a 15 minutos
- Estérilizar por separado a 121 °C por 15 minutos
- Enfriar a 50 °C
- Agregar cuidadosamente la solución de la hemoglobina a la base de gelosa chocolate y mezclar bien sin que se formen burbujas
- Vaseado en cajas petri

3) REACTIVOS

A) CISTEINA AL 4 Y 10%

- Pésar por separado 0.2 g y 0.2mg de cisteina –HCl
- Disolver por separado en 5ml de agua destilada
- Filtrar por separado con membranas de 0.22 μ
- Se recomienda que la cisteína se prepare el mismo día de su uso dado que su caducidad es de corto tiempo

B) UREA AL 10%

- Pésar 20 g de urea
- Disolver en 200 ml de agua destilada
- Filtrar con membranas de 0.22 μ
- Caducidad es de 6 meses

C) ROJO DE FENOL

- Pésar 10 g de rojo de fenol
- Agrégár 520 ml de agua destilada
- Agrégár 30 ml de solución NaOH al 1N
- Agítar por 2 minutos a temperatura ambiente
- Afórar a 1L con agua destilada

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

- Filtrar con papel whatman número 3
- Esterilizar en autoclave a 110 °C durante 10 minutos
- Conservar durante un mes a temperatura ambiente, en frasco ámbar
- Descartar si se presenta un precipitado

D) CEFOBID (Sol. Stock 83.3 mg/250 µl)

- Reconstituir 1 g de cefoperazona en 3 ml de agua bidestilada estéril, agitar hasta que se disuelva y almacenar en alícuotas de 250 µl y congelar a -20 °C

4) REACTIVOS PARA LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

A) Preparación de primers

Primers o iniciadores	Vol. Stock de oligonucleotido	Vol. De agua destilada estéril
UMS-125	73.39 µl	226.61 µ
UMA-226	91.18 µl	208.82 µl

Refrigerar a -70 °C

B) Preparación de DNTP'S A 100 mM

- Descripción
- 100 mM de dNTP's (2' - deoxynucleotido 5' - tiphosphate) consiste de 4 deoxynucleotidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), cada uno a una concentración de 100 mM
- Preparación a un volumen de 400 µl
- Agrégár 360 µl de agua destilada estéril en un tubo endorff
- Adicionar 10 µl cada uno de los DNTPS (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Alícuotar 100 µl en cuatro tubos endorff estériles
- Guárdar a -70 °C

C) Preparación de Buffer PCR A 10X

- Buffer PCR 10X concentración a 17.5 mM de MgCl₂
- Reactivo volumen
- Tris/HCl pH 8.3 M 1 ml

- KCl (100 mM) 5 ml
- MgCl₂ (0.01%) 175 µl
- Agua destilada 3.825 ml

esterilizada

En condiciones de esterilidad adicionar 1 ml de tris-HCl a pH 8.3, 5ml de KCl a 100 mM, 175 µl de MgCl₂ (0.01%) y 3.825 ml de agua esterilizada. disolver la mezcla y alicuotarlos en tubos de 1ml, guardarlos en refrigeración a -70 °C.

D) Buffer de corrimiento TBE A 10X

10X solución Stock 1000 ml

- Tris base 108 g
- Acido bórico 55 g
- EDTA 0.5 M a pH 8.0
- Agitar fuertemente hasta que se disuelvan los reactivos, almacenarlo en un frasco ámbar

E) TBE 1X

- Adicionar 900 ml de agua destilada
- Agrégár 100 ml de TBE 10X
- Disólver fuertemente almacenarlo en un frasco ámbar

F) Agarosa al 2% (Biorad)

- 2 g de agarosa
- Adicionar 50 ml de buffer de corrimiento TBE 1X
- Disólver el medio a temperatura de ebullición durante 2 a 3 minutos

G) Taq Polimerasa

- Taq DNA polimerasa recombinante KCY 413500 unidades: 5 u/µl GIBCO BRL

H) LISIS DE BUFFER DE PROTEINASA K

- Solución A
- Adicionar 1 ml de 1 M Tris 7HCl (pH 8)

- 10 ml de 1 M KCl
 - 0.25 ml de 1 M MgCl₂ δ 88.75 ml de Milli-Q dH₂O
 - esterilizar a 15 libras a 15 minutos
 - Solución B
 - Adicionar 1ml de 1 M tris 7HCl pH 8
 - 0.25 ml de 1 M MgCl₂
 - 1 ml de Triton X-100
 - 1 ml de tween 20 δ 96.75 ml de milli-Q dH₂O
 - esterilizar a 15 libras a 15 minutos
- I) **CEFOBID (Sol. Stock 83.3 mg/250 µl)**

Reconstituir 1 g de cefoperazona en 3 ml de agua bidestilada estéril, agitar hasta que se disuelva y almacenar en alícuotas de 250 µl y congelar a -20 °C

J) BUFFER LOADING DE CORRIMIENTO

- EDTA 25 mM
- Azul de Bromofenol 0.25%
- Xylene cyanol 0.25%
- Glicerol 30%

Para una solución Stock de EDTA a 0.5 M en 5 ml

Se agrega 0.25 g de azul de bromofenol, 0.25 g de Xylene Cyanol, 30 ml de glicerol y 5 ml de agua desionizada, almacenar a temperatura ambiente o a 4 °C.

K) GELATINA

360 µl solución Stock 1 g en 1lt de agua estéril desionizada.

Pesar 20 mg y disolverlos en 200 ml de agua estéril desionizada, realizar alícuotas de 1 ml en tubos ependorff.

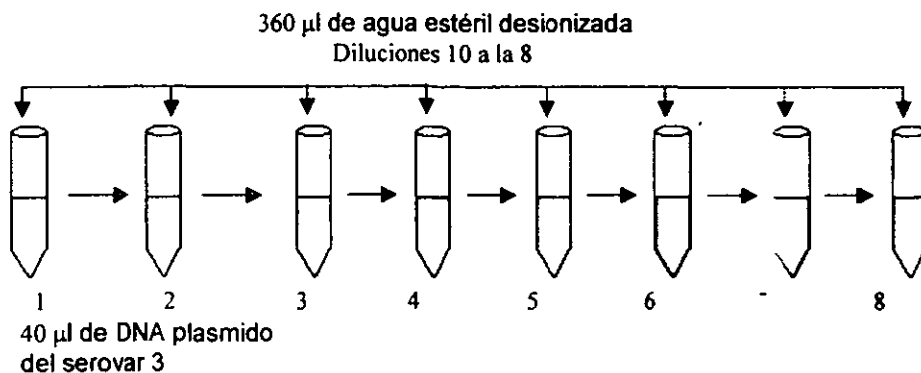
L) CRECIMIENTO DE LA CEPA DE REFERENCIA DEL SEROVAR 3

Tomar 20 µl de la cepa de referencia del serovar 3 e inocular en 200 ml del medio en caldo 10B, e incubar a 37 °C durante 12 horas, de manera que el vire del medio

empezara a cambiar, posteriormente alicuotar 900 μ l en tubos ependorff y guardar a -70 $^{\circ}$ C.

M) CONTROLES INTERNOS

Agregar a cada tubo 360 μ l de agua estéril desionizada y sólo en el primer tubo agregar 40 μ l del plasmido del serovar 3, de este volumen hacer 8 diluciones como se muestra en el esquema de abajo, mezclar perfectamente y guardar a -70 $^{\circ}$ C.



N) BROMURO DE ETIDIO 10 ml (10 mg/ml) (Gibco BRL)

Disolver 100 μ l de Bromuro de etidio en 1 L de agua desionizada y protegerlo de la luz, guardarlo a temperatura ambiente.

Nota: Debido a que el bromuro de etidio es un reactivo altamente cancerígeno este se desecha en un recipiente especial para inactivarlo con carbon activado (sigma) para ello se le agrega 10 g para un litro de desecho del bromuro de etidic

Ñ) DESCOMPLEMENTAR SUEROS

- Descógelar el suero fetal bovino y el suero de caballo durante 24 horas
- Incubar a baño maía a 56 °C. durante 30 minutos.
- Filtrar los sueros con membranas estériles de 0.22 μm .

IX BIBLIOGRAFIA

- 1.-Sosa G.I.E., Narcio R.L.E. Y Zakdivar V.M.C., Aspectos Clínicos Microbiológicos de *Ureaplasma urealyticum*. *Infec.* 1987; 10:491-505.
- 2.-Sanchez P.J. And Regar J.A. Vertical Transmisión of *Ureaplasma urealyticum* From Mother to Preterm Infant *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1990; 9:398-401.
- 3.-Cassell, G.H. Waites K.B. HL. Watson D.T: Crouse and Harawasa R., *Ureaplasma urealyticum* Intrauterine Infección Role in Prematurity and Disease in Newborns, *Clin. Microbiol. Rev.* 1993; (1) 69-87.
- 4.-Shepard, M.C. Lunckenford C.D., Serological Typing of *Ureaplasma urealyticum* Isolated from Arthritis Patient and Agar Growth Inhibition Method, *J. Clin. Microbiol.* 1978, 8:S66-S74.
- 5.-Taylor Robinson D., Csonka G.W.. Laboratory and Clinical Aspects of Mycoplasmas Infección of the Human Genitourinary Trac. in Harris J.R.N. Ed. *Recent Advances in Sexually Transmitted Diseases* London Churchill Livingstone, 151.
- 6.-Gonzalez Pedraza A., Ortiz-Zaragoza M.C., Inzonza-Montiel A.E. Ponce-Rosas E.R., Frecuencia de Aislamiento de *Ureaplasma urealyticum* en una Población Abierta del Sur de la Ciudad de México. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* 1995, 37:79-86.
- 7.-Flacco U., Miller M.J., Carney E., martin W.J., Comparison of Media for isolation of *Ureaplasma urealyticum* and Genital Mycoplasma Species, *J. Clin.*, 1984, 20:862-865.
- 8.-Taylor R.D., McCormack W.M . The genital Mycoplasma Significance of Acute Choriarnionitis. *AM. J. Diagn. Gynecol Obstet.* 1979. 2:127-137.
- 9.-Russel P., Inflammatory Lesions of the Human Placenta Clinical Significance of Acute Chorianionitis, *AM. J. Diafn. Gynecol Obtet.* 1979, 2:127-137.

- 10.-Shepard M.C., *Ureaplasma urealyticum* History and Progress, *Pediatr. Infect. Dis. J.* 6(5) S223-S231.
- 11.-Ken B. Waites Tulio A. Figueroa Terri Schimid D., Comparación de Técnicas de Dilución de Agar y de Caldo para Determinar la Susceptibilidad Antibiótica de *Ureaplasma urealyticum* *Infectologia* 1992, 3:169-182.
- 12.-Robertson J.A., Effect of Gaseous Conditions on Isolation and Growth of *Ureaplasma urealyticum*, *J. Clin. Microbiol.*, 1982, 15:200-203.
- 13.-Shepard M.C., T-form of Pleuroneumoniae Like Organism, *J. Bacteriol.* 1956. 71:362-369.
- 14.-Shepard M.C. Differential Methods for Identification of T- Mycoplasmas Based on Demonstration of Ureasa, 1973, 127(suppl 1):S22-S25.
- 15.-Shepard M.C. Combs., Enhancement of *Ureaplasma urealyticum* Growth on Adifferential Agar Medium (A7B) by Apolyamine,Putrecine, *Clin. Microbiol* 10:931-33.
- 16.-Thrupp L.D. 1986, Susceptibility Testing of Antibiotics in Liquid Media in Antibiotic in Laboratory Medicine 2ed c. Lonan Baltimore: Williams and Wilkins. p.p. 93-150.
- 17.-Robertson J.A. Stember M.E Stemke G.W., Immunoglobulin A A protease Activity of *Ureaplasma urealyticum*. *J Clin Microbiol*, 1984,19:255-258.
- 18.-Britman, N.L. C.M. Froyd E.M. Peterson J., Comparison of Comercially Available Media for Detection and *Mycoplasma homonis*, *J. Clin. Microbiol.* 1992. 30:1335-1337.
- 19.-Desilva W.S. Quinn P.A.. Endogenous Activity of Phospholipases A and C in *Ureaplasma urealyticum* *J. Clin Microbiol.* 1980, 23:354-359.
- 20.-Embree J.E., Krause V.N. Embil J A., Macdonald S., Placental Infection with

- Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* Clinical Correlation** Obstet. Gynecol., 1980, 56:475-481.
- 21.-Fodor M., Difference in the Virulence of *Ureaplasma urealyticum* Isolates. Acta Microbiol. Acad. SC. Hung. 27:161-'69.
- 22.-Cassell G.H., Crouse D.T., Waites K.B., Rud P.T. and Duis J.K., *Ureaplasma urealyticum* Cause Respiratory Disease in Newborns. Pediatr. Infect. Dis. J. 1988, 27:535-541.
- 23.-Shurin P.A., Alpert S. and Bernard-Rosner B.A., Chorioamnionitis and Colonization of the Newborn Infant with Genital Mycoplasmas, N. Engl. J. Med. 1975 293:5-8.
- 24.-Mullis K.B., The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. Scientific American 1990, 262:43-46.
- 25.-Mergory, E.H., Zeckerman Z. and Lunenfeld B., Infection and Male Infertility. Obstet. Gynecol. Survey, 49:283-290.
- 26.-Taylor R.d., Furr P.M, Webster F. y Colbs., *Ureaplasma urealyticum* in the Immunocompromised Host. Pediatr Infect Dis 1986;5(supl 1): S236-237.
- 27.-Driscoll S.G., Chorioamnionitis Perinatal Morbidity, and Mortality, Pediatr. Infect. Dis. 1980, 5:S273-S275.
- 28.-Foy H.M., Kenny G.E. Levinson E M. et. al., Acquisition of Mycoplasma and T-Strain During Infancy, J. Infect. Dis. 121:S74.
- 29.-Russel P., Inflammatory Lesions of the Human Placenta Clinical Significance of Acute Chorioamnionitis, Am. J. Diagn. Gynecol. Obstet, 1979. 2:127-137
- 30.-Ollikainen J., Heiskanen-Kosma et al., *Ureaplasma urealyticum* in Preterm Infants, Act. Pediatr. 1998, 87:1075-1078
- 31.-McCormack WM, Lee Y-H, Zinner S H., Sexual Experience and Urethra

- Colonization with Genital Mycoplasmas a Study Innormal Men, Am. Intern Med. 1973, 78:696.
- 32.-McCormark. W.M. Et. al., Sexual Activity and Vaginal Colonization with Genital Mycoplasma, Jama, 221:1375.
- 33.-Wang E., Smaill F., Infection in Pregnancy in Chalmers J. Emkin M.N. Keirse M.J N.C (Cds). 1989, Effective Care in Pregnancy and Child Birth ed. Oxford university press pp. 534-564.
- 34.-Eschenbach D.A., *Ureaplasma urealyticum* and Premature Birth, Clin. Infect. Dis., 1993 17:100-106.
- 35.-Sanchez P.J. Regan J.A., Vertical Transmission of *Ureaplasma urealyticum* in full Term Infants, Pediatr. Infect. Dis. J. 1987, 6:825-8.
- 36.-Alfa M.j. P.H.I. DJ., Embree E. MD., et. al., Transmission of *Ureaplasma urealyticum* from Mother to Full and Preterm Infants, Pediatr. Infect. Dis. J., 14:341-5.
- 37.-Cassell G.H. Waites K.B. Crouse D.T., Rudd P.T., Canupp K.C., Stayne S. et al. Association of *Ureaplasma urealyticum* Infection of the Lower Respiratory Tract with Chronic Lung Disease and Death in Very Low Birth Weight Infants, Lancet 1988 1:240- 538.
- 38.-Waites K.B., Rudd P.T., Crouse D.T., Canupp K.C., Welson K.G., Ramsey, et. al.. Chronic *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* Infections of Central Nervous system in Preterm Infants, Lancet 1988 1:17-21.
- 39.-Cassell G.H., Davis R.V., Waites K.B., Et. al., Isolation of *Mycoplasma Hominis* and *Ureaplasma urealyticum* from Amniotic Fluid of 16-20 Weeks of Gestation Potential Effect on Outcome of Pregnancy, Sext. Trans. Dis, 1983, 10:294-302.
- 40.-Andrews N.W., Shah S.R., Goldenberg R.L., et. al.. Association of Post Cesarean

- with Delivery Endometritis, *Obstet Gynecol.* 1995, 185:509-514
- 41.-Andrews N.W., Hauth S.C., Goldraber and R.L., et. al., Amniotic Fluid Interleukin 6 Correlation with Upper Genital Tract Microbial Colonization and Gestational Age in Women Delivered after Spontaneous Labor Versu Indicated De'ivery *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1995, 173:606-612.
 - 42.-Gray D.G . Robinson H.B., Mabne J. Et. al., Adverse Outcome in Pregnancy Following Amniotic Fluid Isolation *Ureaplasma urealyticum*, *Pregnat Diagn.* 1992, 12:111-117.
 - 43.-Horowitz S., Mazor M., Romero R., et. al., Infection of the Amniotic Cavity with *Ureaplasma urealyticum* in the Midtrimestre of Pregnancy, *J. Reprod. Med.* 1995, 40:375-379.
 - 44.-Font G.E., Gauthier D.N., Meyer N.J., et. al., Catalase Activity as a Predictor of Amniotic Fluid Culture Results in Preterm Labor or Rupture of Membranes, *Obstet. Gynecol.* 1995, 85:656-658.
 - 45.-Hazan V., Mazor M., Horowitz S., et. al., The Diagnostic Value of Amniotic Fluid Gram Strain Examination and Limulus Amebocyte Lysate Assay in Patients with Preterm Birth, *Act. Obstet. Gynecol. Scand.*, 1995, 74:275-80
 - 46.-Kundsinn R.B., Leviton A., Alfred E.N., et. al., *Ureaplasma urealyticum* Infection of the Placenta in Pregnancies Thatended Prematurely, *Obstet. Gynecol.* 1996, 87:122-127
 - 47.-Kelly U.N . Gariand S.M. and Gilbert G.L., Isolation of Genital Mycoplasmas from the Blood of Neonates and Woman with Pelvic Infection Using Conventional Sps-Free Blood with Pelvic Infection Using Conventional sps Free Blood Culture Media *Pathology.* 1987, 19:277-280.
 - 48.-Newman-Simba U., Ranaudin H., Barbeyrac B., et. al., Isolation of Genital Mycoplasma from Blood of Febrile Obstretical Gynecologie Patients and Neonate.

- Scand, J. Infect Dis. 1992, 24:317-321.
- 49.-Syrogianopoulos G.A., Kapeters-Zoumbos K., Dacavalos G.V. et al. *Ureaplasma urealyticum* colonization of Full Term Infants Perinatal Acquisition and Persistence During Early Infancy. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1990, 9:236-240.
- 50.-Foulton W., Waessen S.A., Deweele M., Lauwers S. and Amy J.. Chronic *Ureaplasma urealyticum* Amnionitis Associated with Aruptio Placentae, *Obstet. Gynecol.* 1986, 68:280-282.
- 51.-Narcio R.I., Solorzano S.F., Arredondo J.L., Caldera J.E., Beltran Z.M.N., Etiología en Infección Cervicovaginal en Pacientes Embarazadas y No Embarazadas, *Gynecol. Obstet.*, 1989, 67:41-46.
- 52.-Embil J.A., Perciara L.H., Prevalence of *Chlamidia trachomatis* and Genital Mycoplasmas in Asintomatic Women *Can. Med. Asosoc., J.* 133:34-35.
- 53.-Lee A.L.L., and Romanujan T., Molecular Diagnosis of *Ureaplasma urealyticum* Septic Arthritis in a Patient with Hypogamma Globulinemia, *Arthr. and Rheum.* 1992 4(35):443-448.
- 54.-Davies P.A. and Gutherfors L.A., Bacteremia Infection of the Cerebral Nervous and Respiratory System, in *Bacterial Infections of the Fetus and Newborn Infant.* Philadelphia N.B., Saunders, 1984:122-42
- 55.-Taylor-Robinson D., McCormack W.M., 1979 Mycoplasma in Genitourinary Infections Intully J.G whitcomb R.F. Ed. *The Mycoplasmas.* Vol. 2 New York Academic Press, pp 307-
- 56.-Cassell G.H., Waites K.B., Davis J.K., and Gibbs R.S., The Role of *Ureaplasma urealyticum* in Amnionitis, *J. Pediatr Infect.*, 1986 5:S247-S252
- 57.-Basolo F., Zanchett R., Effect of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* on Hamsto Egg in Vitro Penetration by Human Spermatozoa Fertil,

Stenl. 1985. 43:110-114

- 58.-Committee to Study the Prevention of Low Birth Weight, Division of Health Promotion and Disease Prevention and Institute of Medicine preventing low birth weigh Washington, D.C.:National Academy Press, 1985.
- 59.-Edward H., Kass M.D., Juey-Shinn P.H.A. And William M., MacCormack N.D., Low Birth Weigh and Maternal Colonization with Genital Mycoplasmas, *Pediatr. Infect Dis.* 1986. 5:S279-S281.
- 60.-Hauth J.C.: Goldenberg R.L., Andrews N.W. Et. at., Reduced Incidence of Preterm Delivery with Metronidazole and Erythromycin in Women with Bacterial Vaginosis, *N: Engl. J. Med.*, 1995, 333:1732-1736.
- 61.-Hillier S.L Nugent R.P., Eschenbach D.A. et. al., Asociation Between Bacterial Vaginosis and Preterm Delivery up.Below-birth Weight Infant, *N. Eugl J. Med.*, 1995. 1737-1742.
- 62.-Quinn P.A., Gillen J.E., Markestad T. et. al., Intrauterine Infection with *Ureaplasma urealyticum* as Acause of Fetal Neonatal Pneumonia, *Pediatr. Infect. Dis.*, 1985, 4:S38-S43.
- 63.-Ohlsson A Wang E. Ulearncombe M., Leucocyte Counts and Colonization with *Ureaplasma urealyticum* in Preterm Neonates, *Clin. Infect. Infect. Dis* 1993 17:144-147.
- 64.-Panero A , Pacifico L., Russi N., et. al.,*Ureaplasma urealyticum* as Cause of Pneumina in Preterm Infants: Analysis of the White Cell Response, *Arch. Dis. Child.* 1995. 73:37-40.
- 65.-Payne N R., Steinberg S.S., Ackmen P. Et. al., New Prospective Studies of the Asociation of *Ureaplasma urealyticum* Colonization and Cronic Lung Disease, *Clin Infect Dis.* 1993. 17:117-121.

- 66.-Groneck P., Goetze-Speer B., Inflammatory Broncopulmonary Response of Preterm Infants with Microbiol Colonization of the Airways of Birth, Arch. Dis. Child, 1996, 74:51-53.
- 67.-Petterson A.M., Lovchik J., Taciak U., et. al., Association of Lung Lavage Interleukin 1- β with *Ureaplasma urealyticum* Colonization in L.B.E., Infants Pediatr, 1996, Res, 39:300
- 68.-Stancombe B.B., Walsh W.F., Derdak S., et. al., Induction of Human Neonatal Pulmonary Fibroblast Cytokines by Hiperoxia and *Ureaplasma urealyticum*, Clin. Infect. Dis.1993, 17:154-157.
- 69.-Quinn P.a., Butang J., Chipman M. et. al., Aprospective Study of Microbial Infection in Still Birth and Early Neonatal Death, Am. J. Obstet. Gynecol., 1985, 151:238-249.
- 70.-Quinn P.A., Rubins S., Nucilla D.M., et. al., Serological Evidence of *Ureaplasma urealyticum* Infection in Neonatal Respiratory Disease Vale, J. Biol. Med., 1985, 56:S65-S72.
- 71.-Rudd P.T.and Camington D., Aprospective Study of Chlamidial; Mycoplasmal and *Ureaplasma urealyticum* Infections in a Neonatal Intensive Care Unit., Arch. Dis. Child, 1985, 59:120-125.
- 72.-Sanchez J.P. and Regan J.A., *Ureaplasma urealyticum* Colcnization and Chronic Lung Disease in Low Birth Weight Infant, Pediatr. Infect. Dis. J., 1988, 7:542-546.
- 73.-Wayege R.L., Dellinyer W.S. and Bane N.A., Fetal and Maternal Features of Antenatal Bacterial Infections, J. Pediatr, 1971, 79:733.
- 74.-Rudd P.T., Cassell G.H., Waites K.B., et. al., Experimental Production of *Ureaplasma urealyticum* Pneumonia and Demostration of Age Related Susceptibility, Infect. Immun., 1989, 57:918-925.

- 75 -Wang E L., Fragma H.R., Watts J. et. al., Role of *Ureaplasma urealyticum* and Other Pathogens in the Development of Chronic Lung Disease of Prematurity
Pediatr. Infect. Dis. J. 1988, 7:547-5.
- 76 -O Brodovich H., Mellins R. State of the art: Bronchopulmonary Displasia
Unresolved Neonatal Acute Lung Injury, Am. Rev. Resp. Dis. 1985, 132:694-709
- 77 -Merritt T.A., Northway W., Buynton B.R. et. al., The Displasia Bronchopulmonary
(BPD) problem, Pediatr., 1991, 58:189-191.
- 78 -Dyke M.D., Graug A. Kohen R., et. al., *Ureaplasma urealyticum* in Neonatal
Intensive Care Population, J. Pediatr. Clin. Healt, 1993, 29:235-237.
- 79.-William F. Walsh Jeffrey Butter, Jackeline Cualson, Dunne Hensey, Gail H. Cassell
and Robert A., Delemus Aprimate Model of *Ureaplasma urealyticum* Infection in
the Premature Infant with Hialine Membrane Disease, 1993 (7 Supp 5):58-61
- 80 -Riles Algun Ross and Meintosh N., Infection with *Ureaplasma urealyticum* and
Mycoplasma hominis and the Development of Chronic Lung Disease in Preterm
Infants Acta Pediatr. 1996, 85:482-4.
- 81.-Jonsson B., Ryfander M. and Faxhus G., *Ureaplasma urealyticum* Entromycin and
Respiratory Morbidity in High Risk Preterm Neonates, Acta Pediatr. 1998, 87:1074-
84.
- 82.-Macolm J. and Micnlosh N., Interleukin 8 in Bronchoalveolar Secretions as
Predictor of Chronic Lung Disease in Premature Infants. Lancet 1994 343:729.
- 83 -Delgado I. Alberto 1994, Laboratorio de Microbiologia Edit. Interamericana MC. Graw
Hill. España pp. 397-398.
- 84 -Cualson U., Kuchi T.J. Pihoda T.J. and Lemus R.A., Diffuse Alveolar Damage in
the Evolution of Broncopulmonary Displasia in the Babons Pediatr Res., 1988
24:357-66.

- 85.-Groneck P., Gotze-Speer B., Opperman M., Eiffert H. And Speer C.A. Association of Pulmonary Inflammation and Increased Microvascular Permeability During the Development of Bronchopulmonary Dysplasia: A sequential analysis of Inflammatory Mediators in Respiratory Fluids of High Risk Preterm Neonates. *Pediatrics*, 1994, 93:712-18.
- 86.-Watts C.L., Fanaroff A.P. and Broce M.C.. Elevation of Fibronectin Levels in Lung Secretions of Infants with Respiratory Distress Syndrome and Development of Bronchopulmonary Dysplasia. *J. Pediatr.*, 1992, 120:614-20.
- 87.-Kotch S., Wanyou A., Silverman M. and Shar R.J., Increase in the Concentration of Transforming Growth Factor β 3 in Bronchoalveolar Lung Disease of Prematurity. *J. Pediatr.*, 1996, 128:464-9.
- 88.-Neal T.J., Rue M.F.E. and Shaw N.J. Spontaneously Resolving *Ureaplasma urealyticum* In Meningitis. *E.U. J. Pediatrics*, 1994, 153:342.
- 89.-Quinn P.A., Hes L. And D'Amico M. Serological Response to *Ureaplasma urealyticum* in the Neonatal. *Can. Infect. Dis.* 1993, 17(Suppl S1):36-43.
- 90.-Herrmann R., Genome Structure and Organization in Manicoff. M.C. Elhaneg RN. Finch LR. and baseman JB. 1992 *Mycoplasma Molecular Biology and Pathogenesis*, edit. American society for Microbiology Washington D.C. pp. 157-165.
- 91.-Waites K.B., Crosse D.T. and Cassel G.H., Therapeutic for *Ureaplasma urealyticum* infections in Neonates. *Clin Infect Dis.* 1993, 17(Suppl 1):S208-14.
- 92.-Nathaniel R. Pagne, Susan S. Stanbarr. et. al., New Prospective Studies of the Association of *Ureaplasma urealyticum* Colonization and Chronic Lung, Disease. *CID*: 17 (supl. 1), S17-21
- 93.-Linn R.J. Guidia P.A., Hoernwegue E.J. and Smith P.F., Humoral Immune Response of Rabbits to *Choleplasma Lipoglycans*, *Infect. Immunol.*, 1990, 24:926-933.

- 94.-Barrera Saldaña H.A., Ortiz L.R., Rojas M.A. y Resendiz P.D. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), Ciencia y Desarrollo, 1993, 50-60.
- 95.-Jonsson B., Kerell A.C., Ringertz S., Rylander M. and Kaxeliusg. Neonatal *Ureaplasma urealyticum* Colonization and Chronic Lung. Acta Pediatr., 1994, 83 927-30.
- 96.-Shepard M.C., Culture Media for *Ureaplasma* in Razin S Tully, JG. Editors Method in Mycoplasmaology Vol. 1 New York Academic Press. 1983, 37-46.
- 97.-Eisenstein B.J., The Polymerase Chain Reaction a New Method of Using Molecular Genetics for Medical Diagnosis, N. Engl. J. Med., 322:178-183.
- 98.-Peter J.B., The Polimerase Chain Reaction Amplifying our Option, Rev. Infect., Dis., 13:166-171.
- 99.-Ollikainen J., Hickkaime H., Korppi M., Sarkkinen H. And Heinonen K., *Ureaplasma urealyticum* Infection Associated with Acute Respiratory Insuficiency and Death In premature Infant, J. Pediatr., 1993, 122:756-60.
- 100.-Castillo C.R., Solorzano S., Presencia de *Ureaplasma urealyticum* en Niños con Insuficiencia Respiratoria Aguda y Neumonitis, Enfer. Infecc Microbiol., 1994, 4(14):279.
- 101.-Teng J.L., Zhen X., et. al. *Ureaplasma urealyticum* Biovar Specificity and Diversity are Encoded in Multiple-Banded Antigen Gene. Journal Clinical Microbiology, 1994 32(6): 1464-1469.
- 102.-Watson H.L., Blalock D.K. And Cassell G.H., Variable Antigens of *Ureaplasma urealyticum* Containing Both Serovar-specific and Serovar Cross-reactive Epitopes. Infect. Inmun., 1990, 58:3679-3688.
- 103.-Bancalaris E. Bronchopulmonary Displasia, Clin., Presentation. J. Pediatr., 1979, 95 819-23.

- 104 -Robert Romero, Gonzales rogelio et. al., Microbial Invasion of the Amniotic Cavity in Patients with Suspected Cervical Incompetence, Prevalence and Clinical Significance, Am. J. Obstet. Gynecol., 1992, 107:1089-91.
- 105.-Pablo J. Sánchez, M.D and Joan A. Regan, M.D. Vertical Transmission of *Ureaplasma urealyticum* in Full Term Infants, *Pediatr. Infect.*, 1987, 6(9): 825-828.
- 106.-Blanchard, Hentschel J., Duffy L., and Baldus K., Detection of *Ureaplasma urealyticum* by Polymerase Chain Reaction in the Urogenital Tract of Adults in Amniotic Fluid, and in the Respiratory Tract of Newborns, *Clinical Infectious Diseases*, 1993.; (suppl 1): S148-53.