

MINSAP

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"

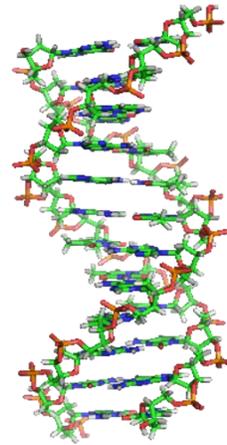
Vice Dirección de Microbiología

Departamento de Bacteriología - Micología

Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de Micoplasmas

**Amplificación de ácidos nucleicos  
para el diagnóstico de infecciones  
por micoplasmas y ureaplasmas de  
interés clínico en Cuba**

**Tesis en opción al grado científico de  
Doctor en Ciencias de la Salud**



**Autora: Dra. Carmen Fernández Molina. MC**

**La Habana, año 2012**

**IPK**



Instituto

Pedro Kourí

**MINSAP**  
**Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”**  
**Vice Dirección de Microbiología**  
**Departamento de Bacteriología - Micología**  
**Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de Micoplasmas**

**Amplificación de ácidos nucleicos para el diagnóstico  
de infecciones por micoplasmas y ureaplasmas de  
interés clínico en Cuba**

**Tesis en opción al grado científico de  
Doctor en Ciencias de la Salud**

**Autora: Dra. Carmen Fernández Molina. MC**

**Asesores: Prof. Alina Llop Hernández. DrC.  
Prof. Siomara Martínez Marrero. DrCs.  
Prof. Susana Vázquez Ramudo. DrCs.**

**La Habana, año 2012**

## AGRADECIMIENTOS

Me complace iniciar estos agradecimientos mencionando primero a mi mamá y a mi papá, después a mis profesores, compañeros, colegas y amigos, a los de siempre y los de ahora, los que veo cada día y los que encuentro de vez en cuando. Aquellos a los que siempre recuerdo y a los que sin querer olvido. A los de las horas de alegría y a los de las horas difíciles. Aquellos, que me educaron con una actitud de consagración ante la ciencia. A los que tuve la oportunidad de transmitirles conocimientos y de los que también tomé.

En particular, hay nombres que debo mencionar, sin embargo sería un “por supuesto”, pues ustedes saben cuales son, sin embargo es preciso que queden escritos, al menos los que en esta etapa de mi actividad científica me han educado, exigido y apoyado para la culminación de este trabajo de tesis doctoral, los que menciono a continuación:

- Al siempre Profesor Gustavo Kourí, ejemplo de hombre de ciencia para todos, que aunque ya no esta su persona, él sigue entre nosotros.
- A la Dra. Arelides Martínez, ejemplo de mujer enamorada de la vida, de la que siempre obtuve conocimientos, principalmente sobre la micoplasmología, ella tampoco ya no esta entre nosotros, pero decir micoplasmas y decir Arelides.
- A la siempre Dra. Alina Llop, que un día del año 1994 me recibió en el IPK, donde aún estoy y siempre junto con oportunos y educativos consejos, regaños y escuchas, he recibido de ella el ejemplo de mujer cubana de todos los tiempos. Gracias.
- A la Prof. Guadalupe Guzmán, mujer de ciencia, a la que admiro y respeto, también gracias.
- A la Prof. Nereyda Cantelar, siempre en vigilia para la formación docente de todos nosotros, gracias profe.
- A los profesores menos jóvenes, Prof. Pedro Mas Lagos, Prof. Goyenechea y Prof. Finlay, a todos gracias por haberme dado la oportunidad en algún momento de intercambiar con ustedes y por tenerlos aun entre nosotros.
- Al Dr. Gerardo Martínez, mi primer Jefe de Departamento aquí en IPK, gracias.
- Al Dr. Ernesto Montoro, mi actual Jefe de Departamento, gracias.
- A mis colegas, amigas y amigos del Departamento de Bacteriología-Micología del IPK.
- También a colegas, amigas y amigos de la Vice-dirección de Microbiología del IPK.
- A los de la Vice-dirección Docente del IPK.
- A todos los compañeros trabajadores del IPK, Gracias!!

A quienes debo mencionar ahora, nada mas y nada menos, a los que día a día me soportan, de los que aprendo, los que me escuchan mis aciertos y desaciertos, me exigen y me toleran, ellos son:

- Ana Margarita Obregón, ya Doctora en Ciencias!!, además de licenciada, profesora, científica, esposa, madre, compañera y amiga, también mi gran locomotora en la vida, el trabajo y en esta tesis, muchas gracias Ana !!!
- Islay Rodriguez, también con todos sus atributos profesionales, además de padre y esposo, compañero y amigo en las buenas y en las malas, gracias!!
- Jose Rodríguez, mi técnico laboral y amigo personal de todos los tiempos, gracias!!
- Brian Mondeja, joven colega y amigo, que se insertó en mi vida de la micoplasmología del que aprendo todos los días, y me ha dado todo el apoyo que he necesitado para el desarrollo de esta tesis, gracias!!
- Nadia Rodríguez, micoplasmóloga y joven mamá, de la que también he aprendido, gracias!!
- Eduardo Echevarría, mi técnico micoplasmólogo, emprendedor y desafiante en el trabajo, también joven papá, gracias!!

- Yaindrys Rodríguez, ya iniciada en sus temas moleculares, gracias por estar siempre a mi escucha científica y personal, también por tolerarme mis exigencias.
- Yanais Valdez, pronto serás otra joven mamá, gracias por poder transmitirte conocimientos y también haber aprendido de tu juventud presumida.
- Angel Noda, joven de última adquisición del 2011, gracias por también estar entre nosotros, y tener el privilegio de discutir temas científicos en el grupo.

A otros, quiénes? bueno....

- A mi primo Carlos Fernández, que al llegar al IPK en el 94, lo identifiqué como ejemplo de compañero y amigo, por su exigencia en lo científico y personal, gracias por tus siempre análisis oportunos en temas científicos, sociales, culturales y políticos.
- Al Dr. Rafael Llanes, colega, compañero y amigo, que aunque no este en Cuba, por estar en misión en Haití, desde los inicio me transmitiste conocimientos médicos y microbiológicos, además de tu siempre amistad incondicional, Gracias!
- A la Dra. Susana Vazquez, una de mis asesoras y amiga de siempre dándome animo y exigiéndome para culminar esta tesis, gracias!
- Al Dr. Raúl Díaz, biólogo molecular, compañero y amigo, gracias!!
- A la Siomara Martínez mi otra locomotora y asesora de esta tesis, además de compañera y amiga de siempre, gracias hermana!
- A mis otras hermanas del CENSA, Maricela Santos y Lilian Sanchez, las que me han apoyado y exigido en todo momento para la realización de esta tesis, gracias!
- A mi relevo y amiga Dra. Evelyn Lobo, gracias!
- A las tres amigas: María Teresa, Ileana y Diadenis, por sus oportunas observaciones y comentarios sobre el documento, además de sus sonrisas, gracias!
- A mi compañera de cuarto en Jamaica, siempre colega y amiga, Dra. Mayra Muné, Gracias!
- A la Doctorísima Gilda Toraño, gracias por tus señalamientos y comentarios para un mejor documento de tesis!
- A la Dra. Laura Bravo, gracias por tu siempre reconocimientos al trabajo del grupo de micoplasmas, además por tus comentarios oportunos.
- A la Dra. María Eugenia y Dr. Bali, quienes oportunamente me ayudaron a enfocar el documento de tesis, gracias.
- A Ernesto y Ediel, servidores oportunos y brillantes, gracias!
- A Lázaro, dibujante y amigo de todos, gracias!
- A Mery y a Manelo, gracias!
- A la amiga de alegres y difíciles momentos, la Dra. Lilia M. Ortega, gracias amiga!
- También a mis vecinos de la calle 96, al Curo, Margarita, Chiqui, Luvia, Aredis, Gracias!
- A mi excepcional amigo Otto, muchas gracias!

Estoy segura de haber omitido a alguien, pero fue involuntariamente, expresión que lo resuelve, sino todo, casi todo.

Pero, un momento!! un agradecimiento muy, pero muy especial, y es para mis dos hijos: mi ALAN y mi CLAUDIA, que junto con la Katica, Ale, Alancito, Mine y Cami, mi vida florece diariamente, lo que me ha permitido entre otras actividades, culminar este trabajo de tesis doctoral. Gracias!!!

## SÍNTESIS

Se presentó un conjunto de resultados encaminados a la implementación de variantes de un método molecular basado en la amplificación del ADN para el diagnóstico de especies de micoplasmas y ureaplasmas de importancia clínica. A partir de cebadores reportados en la literatura, se desarrolló una PCR-Simple para clase *Mollicutes* y una PCR-Anidada para *Mycoplasma pneumoniae*, *M. hominis*, *M. fermentans* y *Ureaplasma urealyticum*, también se desarrollaron PCR-Múltiple para *U. parvum* y *U. urealyticum*, PCR-Simple para *M. genitalium* y PCR-Múltiple para *M. hominis*, *M. genitalium*, *U. parvum* y *U. urealyticum*. En estudios de validación estas variantes de PCR fueron específicas para cada cepa de referencia y fueron aplicadas en estudios de muestras clínicas de pacientes con sospecha de infección por micoplasmas y ureaplasmas. En pacientes con síntomas respiratorios positivos al VIH predominaron *M. hominis*, *M. fermentans* y *U. urealyticum*, en mujeres infértiles predominó *U. parvum* y en pacientes con síntomas urogenitales *M. hominis* y *M. genitalium* predominaron en hombres y *U. parvum* en mujeres. Estos resultados constituyen los primeros aportes sobre el diagnóstico por métodos moleculares de micoplasmas y ureaplasmas, además de la identificación de un mayor número de especies estudiadas por primera vez en Cuba.

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ARNr: ácido ribonucleico ribosomal

ARNt: ácido ribonucleico de transferencia

ATCC: colección de cultivos tipo americana

ATP: trifosfato de adenosina

E.U.A: Estados Unidos de América

ELISA: ensayo inmunoenzimático ligado a fase sólida

HAN: hibridación de ácidos nucleicos

HDRGC: Hospital Docente Ginecobstétrico “Ramón González Coro”

HMCJF: Hospital Militar “Carlos Juan Finlay”

IPK: Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

LNRIM: Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de Micoplasmas

MFE-2: estuche de diagnóstico comercial *Mycofast Evolution-2*

MINSAP: Ministerio de Salud Pública

pb: pares de base

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PCR-TR: PCR en tiempo real

PPO: organismo de la pleuroneumonía

PPLO: organismos similares al de la pleuroneumonía

RFLPs: polimorfismo de restricción por tamaño de fragmento

RP: razón de prevalencia

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida

TCR: receptor de células T

T<sub>m</sub>: temperaturas *melting*

T<sub>a</sub>: temperatura de *annealing* o de hibridación

TFS: tampón fosfato salina

VIH: virus de inmunodeficiencia humana

UCC: unidades cambiadoras de color

UFC: unidades formadoras de colonias

UH: Universidad de La Habana

UNG: uretritis no gonocócica

## ÍNDICE

	Pág.
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1 Introducción	2
1.2 Hipótesis	7
1.3 Objetivos	8
1.4 Novedad científica	9
1.5 Valor teórico	9
1.6 Valor práctico	10
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	11
2.1 Generalidades	12
2.2 Antecedentes históricos	12
2.3 Clasificación taxonómica	15
2.4 Morfología y características fisiológicas	16
2.5 Características culturales de los micoplasmas	19
2.6 Biología molecular y filogenia de la clase <i>Mollicutes</i>	21
2.7 Atributos patogénicos asociados a micoplasmas	23
2.8 Infecciones de micoplasmas asociadas a enfermedades	28
2.9 Diagnóstico microbiológico de las infecciones causadas por micoplasmas	30
2.10 Susceptibilidad antimicrobiana	38
2.11 Tratamiento antimicrobiano para infecciones por micoplasmas	39
2.12 Epidemiología de las infecciones causadas por micoplasmas	40
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	41
3.1 Tipo de estudio	42
3.2 Marco de la investigación	42
3.3 Procedimientos generales por objetivos	42
3.3.1 Desarrollar un método de PCR-Simple y uno de PCR-Anidada para el diagnóstico de <i>M. pneumoniae</i> , <i>M. hominis</i> , <i>M. fermentans</i> y <i>U. urealyticum</i> en muestras clínicas de pacientes con síntomas respiratorios	42
3.3.1.1 Validación del método de la PCR-Simple y PCR-Anidada en cepas de referencia	43
3.3.1.1.1 Procedimientos para la obtención del ADN de cepas de referencia	43

3.3.1.1.2	Procedimientos para la amplificación del ADN de cepas de referencia	44
3.3.1.1.2.1	Método de la PCR-Simple para la detección de la clase <i>Mollicutes</i>	44
3.3.1.1.2.2	Método de la PCR-Anidada para la identificación de <i>M. pneumoniae</i> , <i>M. hominis</i> , <i>M. fermentans</i> y <i>U. urealyticum</i>	45
3.3.1.2	Aplicación del método de la PCR-Simple y la PCR-Anidada para determinar la frecuencia de <i>M. pneumoniae</i> , <i>M. hominis</i> , <i>M. fermentans</i> y <i>U. urealyticum</i> en muestras clínicas de pacientes con síntomas respiratorios	47
3.3.1.2.1	Procedimiento para la obtención del ADN de muestras clínicas	48
3.3.1.2.2	Métodos y procedimientos para la amplificación del ADN de muestras clínicas	48
3.3.2	Desarrollar un método de PCR-Múltiple para el diagnóstico de <i>U. parvum</i> y <i>U. urealyticum</i> e identificar la frecuencia de estas especies y de <i>M. hominis</i> en el tracto genital de mujeres infértiles y fértiles	49
3.3.2.1	Validación del método de la PCR-Múltiple para identificar <i>U. parvum</i> y <i>U. urealyticum</i>	49
3.3.2.1.1	Procedimiento para la obtención del ADN de cepas de referencia	49
3.3.2.1.2	Procedimientos para la amplificación del ADN de cepas de referencia	50
3.3.2.1.2.1	Métodos de la PCR-Simple de <i>U. parvum</i> y PCR-Simple de <i>U. urealyticum</i> .	51
3.3.2.1.2.2	Método de la PCR-Múltiple para <i>U. parvum</i> y <i>U. urealyticum</i>	52
3.3.2.2	Identificación de la frecuencia de <i>M. hominis</i> , <i>U. parvum</i> y <i>U. urealyticum</i> en muestras clínicas de mujeres infértiles y fértiles	53
3.3.2.2.1	Procedimientos y métodos para la identificación de <i>U. parvum</i> , <i>U. urealyticum</i> y <i>M. hominis</i> en muestras clínicas	53
3.3.3	Seleccionar un método de PCR-Simple para el diagnóstico de <i>M. genitalium</i>	54
3.3.3.1	Validación del método de la PCR-Simple para <i>M. genitalium</i> en cepas de referencia	55

3.3.3.1.1 Muestras de ADN de cepas de referencia	55
3.3.3.1.2 Procedimientos para la amplificación del ADN de cepas de referencia	55
3.3.3.2 Identificación de <i>M. genitalium</i> por la PCR-Simple en muestras clínicas de pacientes con uretritis no gonocócica	57
3.3.3.2.1 Procedimientos y métodos	58
3.3.4 Estimar la frecuencia de <i>M. genitalium</i> , <i>M. hominis</i> , <i>U. parvum</i> y <i>U. urealyticum</i> en pacientes con síntomas urogenitales a partir del desarrollo de un método de PCR-Múltiple específico para estas especies de micoplasmas y ureaplasmas	59
3.3.4.1 Validación del método de la PCR-Múltiple para identificar <i>M. genitalium</i> , <i>M. hominis</i> , <i>U. parvum</i> y <i>U. urealyticum</i> en cepas de referencia	59
3.3.4.1.1 Muestras de ADN de cepas de referencia	59
3.3.4.1.2 Procedimientos para la amplificación del ADN de cepas de referencia	59
3.3.4.2 Aplicación de la PCR-Múltiple de <i>M. genitalium</i> , <i>M. hominis</i> , <i>U. parvum</i> y <i>U. urealyticum</i> para estimar la frecuencia e estas especies en muestras clínicas de pacientes con síntomas urogenitales	61
3.3.4.2.1 Procedimientos y métodos	62
3.4. Procesamiento y análisis estadístico de la información	63
3.5. Aspectos éticos	63
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	65
4.1. Desarrollo de un método de PCR-Simple y uno de PCR-Anidada para el diagnóstico de <i>M. pneumoniae</i> , <i>M. hominis</i> , <i>M. fermentans</i> y <i>U. urealyticum</i> en muestras clínicas de pacientes con síntomas respiratorios	66
4.1.1. Validación de las variantes de la PCR en cepas de referencia	66
4.1.1.1 Método de la PCR-Simple para la detección de la clase <i>Mollicutes</i>	67
4.1.1.2 Método de la PCR-Anidada para la identificación de <i>M. pneumoniae</i> , <i>M. hominis</i> , <i>M. fermentans</i> y <i>U. urealyticum</i>	69
4.1.2 Estimación de frecuencia de micoplasmas y ureaplasmas en muestras clínicas de pacientes con síntomas respiratorios	71

4.2	Desarrollo de un método de PCR-Múltiple para el diagnóstico de <i>U. parvum</i> y <i>U. urealyticum</i> e identificación de la frecuencia de estas especies y de <i>M. hominis</i> en el tracto genital de mujeres infértiles y fértiles	75
4.2.1	Validación del método de la PCR-Múltiple para <i>U. parvum</i> y <i>U. urealyticum</i>	75
4.2.1.1	Métodos de la PCR-Simple para <i>U. parvum</i> y <i>U. urealyticum</i>	75
4.2.1.2	Método de la PCR-Múltiple para <i>U. parvum</i> y <i>U. urealyticum</i>	76
4.2.2	Identificación de la frecuencia de <i>U. parvum</i> , <i>U. urealyticum</i> y <i>M. hominis</i> en muestras clínicas de mujeres infértiles y fértiles	78
4.3	Desarrollo de un método de PCR para el diagnóstico de <i>M. genitalium</i>	82
4.3.1	Método de PCR-Simple para <i>M. genitalium</i>	82
4.3.2	Identificación mediante la PCR-Simple de <i>M. genitalium</i> en muestras clínicas de hombres con uretritis no gonocócica	84
4.4	Desarrollo de una PCR-Múltiple para identificar <i>M. genitalium</i> , <i>M. hominis</i> , <i>U. parvum</i> y <i>U. urealyticum</i> y conocer la frecuencia de estas especies en pacientes con síntomas urogenitales	86
4.4.1	Método de PCR-Múltiple para la identificación de <i>M. genitalium</i> , <i>M. hominis</i> , <i>U. urealyticum</i> y <i>U. parvum</i> con ADN de referencia	86
4.4.2	Estimación de la frecuencia de la <i>M. genitalium</i> , <i>M. hominis</i> , <i>U. parvum</i> y <i>U. urealyticum</i> en muestras clínicas de mujeres y hombres con síntomas urogenitales	87
4.5	Consideraciones generales	93
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	97
	Conclusiones	98
<b>VI.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	99
	Recomendaciones	100
<b>VII.</b>	<b>REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS</b>	101
	Referencias bibliográficas	102
	<b>PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DE LA AUTORA</b>	123
	Producción científica de la autora relacionada con el tema de tesis	124
	Producción científica de la autora no relacionada con el tema de tesis	130
	<b>ANEXO</b>	

## **I. INTRODUCCION**

## I. INTRODUCCION

### 1.1 Introducción

Los micoplasmas o mollicutes son los microorganismos más pequeños y simples con capacidad de replicación autónoma, clasificados como bacterias carentes de pared celular, característica distintiva que les permite agruparlas en la clase *Mollicutes*. Ellos están diseminadas ampliamente en la naturaleza, como parásitos comensales o patógenos en humanos, otros mamíferos, reptiles, peces, artrópodos y plantas. Estos microorganismos se encuentran principalmente colonizando las superficies mucosas mediante mecanismos de adhesión, pues necesitan del estrecho contacto con las células hospederas para la asimilación de nutrientes vitales y factores de crecimiento, como es el caso de los precursores de ácidos nucleicos y el colesterol que no pueden ser sintetizados por estos microorganismos por su reducido genoma (Razin, 1983<sub>a</sub>; Brooks et al., 2007; Garrity et al., 2007).

En el humano se describe la presencia de especies de micoplasmas como residentes de la microbiota normal y un número importante de otras especies se consideran patógenas en adultos y niños de ambos sexos. La infección por micoplasmas es a menudo subclínica y crónica, siendo aún pobremente conocidos los mecanismos moleculares de su patogenicidad. Cada especie tiene sitios de colonización preferentes, donde se encuentra

con mayor frecuencia, pero durante la infección puede diseminarse por diferentes sitios del hospedero (Krause et al., 1992; Pérez et al., 2001; Waites et al., 2005).

En el aparato respiratorio las especies más frecuentes son *Mycoplasma salivarium* y *M. orale*, además *M. buccale*, *M. faucium* y *M. lipophilum*, las que forman parte de la microbiota normal de la orofaringe, mientras *M. pneumoniae* puede encontrarse tanto en el tracto superior como en el inferior, siendo una de las especies más estudiadas por ser el agente etiológico de la neumonía atípica primaria y ser causa del 40% de las neumonías adquiridas en la comunidad. Además, *M. pneumoniae* puede producir faringitis, bronquitis y miringitis. En pacientes con asma bronquial se reporta *M. pneumoniae* entre el 24% y 56% de los casos; también niños con hipogammaglobulinemia desarrollan infecciones respiratorias y articulares por este microorganismo. Por otro lado, el 25% de las personas infectadas con *M. pneumoniae* pueden experimentar complicaciones extrapulmonares (Krause et al., 1992; Pérez et al., 2001; Waites et al., 2004; Garnier et al., 2005).

*M. hominis* y *Ureaplasma urealyticum* son especies aisladas por primera vez del aparato urogenital, y aunque pueden ser parte de la microbiota normal de la vagina, también pueden estar asociadas a uretritis no gonocócica, pielonefritis, vaginosis bacteriana, cervicitis, enfermedad pélvica inflamatoria y complicaciones durante el embarazo, además de infertilidad. *M. genitalium*, *M. spermatophilum* y *U. parvum* son aisladas por primera vez del aparato urogenital y se asocian con alteraciones del tracto urogenital antes mencionadas (Donders et al., 2000; Jensen, 2004; Cervantes, 2009; Günyeli et al., 2011).

Otras especies como *M. fermentans*, *M. pirum*, *M. penetrans* y *M. amphoriforme*, aisladas de diferentes sitios anatómicos, son asociadas a enfermedades del tracto respiratorio y urogenital, además a artritis séptica, meningitis, bacteriemias, endocarditis, infecciones de la piel y afecciones del sistema inmune, principalmente en individuos inmunocomprometidos, como los seropositivos al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Lo, 1992; Montagnier et al., 1993).

Desde el descubrimiento y la caracterización del VIH, queda establecido este agente infeccioso como causa del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida). Sin embargo, muchos investigadores observan un número de factores inexplicables que crean dudas en la hipótesis simplista de la etiología retroviral única del sida. En la búsqueda de estos factores se incluyen agentes infecciosos no VIH, entre ellos a los micoplasmas, debido a nuevas especies encontradas en pacientes inmunodeprimidos (Lo, 1992; Montagnier et al., 1993).

Lo, en 1992, plantea tres posibles hipótesis sobre la infección con micoplasmas y su asociación con el sida (Lo, 1992):

- Los micoplasmas pueden causar infecciones oportunistas por encontrarse en pacientes inmunocomprometidos con sida.
- Las infecciones con *M. fermentans* y *M. penetrans* aumentan marcadamente la patogenicidad de los virus, incluyendo el VIH, un fenómeno demostrado por estudios in vitro.
- Las infecciones con algunas especies de micoplasmas pueden promover la progresión del sida, según experimentos realizados en primates no humanos.

Múltiples son las infecciones en las que están asociadas especies de micoplasmas y ureaplasmas, siendo necesario el diagnóstico de laboratorio, donde se utilizan métodos de cultivo, serológicos y de biología molecular.

Los métodos de cultivos para el diagnóstico de micoplasmas y ureaplasmas son realizados en medios libres de células o en líneas celulares, éstos se reconocen por su alta sensibilidad, aunque también son laboriosos y tienen un alto costo económico, debido a que los micoplasmas requieren medios selectivos y exigen de condiciones muy específicas para su viabilidad y multiplicación *in vitro*. Además, por el lento crecimiento de estos microorganismos, los resultados del diagnóstico se obtienen a partir de las dos semanas y no siempre son satisfactorios (Brooks et al., 2007).

Los métodos serológicos, principalmente para infecciones producidas por *M. pneumoniae*, son cuestionados por su especificidad y sensibilidad, debido a las reacciones cruzadas existentes entre las múltiples especies de micoplasmas, así como también por los niveles de anticuerpos que pueden variar entre pacientes y el momento de la toma de la muestra clínica (Tully, 1995, Ainsworth et al., 2000; Martínez et al., 2008).

Los métodos de biología molecular, como por ejemplo la hibridación de ácidos nucleicos (HAN) y la amplificación del ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), son ampliamente utilizados para el diagnóstico de infecciones por micoplasmas y ureaplasmas. Estos métodos superan en cuanto a sensibilidad, especificidad y rapidez a los métodos de cultivo y a los serológicos, lo que facilita aplicar una conducta médica oportuna (Yoshida et al., 2003; Martínez et al., 2008; Deutschmann et al., 2010).

Varias PCR son reportadas para la identificación de las principales especies de micoplasmas y ureaplasmas, donde las secuencias dianas corresponden a genes específicos, como el del ARN ribosomal 16S que es uno de los más utilizados, por sus regiones variables, semivariantes y universales, además por considerarse una molécula estable, según los estudios de clasificación filogenética sobre estos microorganismos. Otras dianas especie-específica se identifican a partir de genes que codifican para proteínas, como el gen *p1* de *M. pneumoniae* y el *mgpa* de *M. genitalium*, además el gen de la ureasa y el de regiones espaciadoras entre genes, reportadas dada su variabilidad nucleotídica entre las especies de un mismo género (van Kuppeveld et al., 1992; Kong et al., 2000; Jensen et al., 2003; Hardick et al., 2006)

En Cuba, los métodos moleculares basados en la HAN y la PCR para la detección de especies de micoplasmas y ureaplasmas, se inician en los años 1990 en el sector de la medicina veterinaria para el diagnóstico de *M. bovis*, *M. bovisgenitalium*, *M. gallisepticum*, *M. hyorhinis* y *M. hyopneumoniae*, extendiéndose estas tecnologías al estudio de muestras de cultivo de células y de procesos biofarmacéuticos, que pueden contaminarse con especies de micoplasmas (Chávez et al., 1996; Martínez et al., 1996).

En humanos, el diagnóstico de laboratorio de micoplasmas y ureaplasmas se reporta por vez primera por Fedoseev et al., (1974), quienes a partir de muestras de cultivo de células obtienen crecimiento de colonias características de micoplasmas en medios selectivo, sin llegar a identificar la especie en cuestión (Fedoseev et al., 1974).

En muestras clínicas del tracto respiratorio, según comunicación personal que realiza Zaes (1996) el diagnóstico de infecciones por *M. pneumoniae* se realiza mediante métodos de cultivo bacteriológico y pruebas bioquímicas, sin estudiar otras especies de micoplasmas y ureaplasmas asociadas a infecciones respiratorias (Zaes SC. [comunicación personal] Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. La Habana. Cuba. 1996).

Almanza en el 2001, refiere el estudio de *M. hominis* y *U. urealyticum* en muestras urogenitales de hombres y mujeres, a través de métodos de cultivo bacteriológico y pruebas bioquímicas (Almanza, 2001).

Sin embargo, otras especies también de origen humano como *M. genitalium*, *M. fermentans*, *M. penetrans*, *M. spermatophilum*, *M. amphoriforme* y *U. parvum* no se diagnostican, y por tanto no se estudian como causa de enfermedades e infertilidad en pacientes cubanos.

De esta forma se propone con este trabajo contribuir a la identificación de un mayor número especies de micoplasmas y ureaplasmas en pacientes cubanos, mediante la utilización de un método molecular basado en la amplificación del ADN.

## **1.2 Hipótesis**

La implementación de variantes de un método molecular basado en la amplificación de ácidos nucleicos, permite incrementar la capacidad diagnóstica de un mayor número de especies de micoplasmas y ureaplasmas en pacientes con sospechas de infecciones por estos microorganismos.

### 1.3 Objetivos

#### **Objetivo general:**

Implementar variantes de un método molecular basado en la amplificación de ácidos nucleicos para el diagnóstico de infecciones por micoplasmas y ureaplasmas de importancia clínica.

#### **Objetivos específicos:**

1. Desarrollar un método de PCR-Simple y uno de PCR-Anidada para el diagnóstico de *M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. fermentans* y *U. urealyticum* en muestras clínicas de pacientes con síntomas respiratorios.
2. Desarrollar un método de PCR-Múltiple para el diagnóstico de *U. parvum* y *U. urealyticum* e identificar la frecuencia de estas especies y de *M. hominis* en el tracto genital de mujeres infértiles y fértiles.
3. Seleccionar un método de PCR-Simple para el diagnóstico de *M. genitalium*.
4. Estimar la frecuencia de *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. parvum* y *U. urealyticum* en pacientes con síntomas urogenitales a partir del desarrollo de un método de PCR-Múltiple específico para estas especies de micoplasmas y ureaplasmas.

#### **1.4 Novedad científica**

Se desarrolla y aplica por primera vez en Cuba un método molecular basado en la amplificación de ácidos nucleicos para el diagnóstico de especies de micoplasmas y ureaplasmas de interés clínico en salud pública. Los resultados alcanzados han contribuido a elevar el conocimiento de nuevas especies de mollicutes asociadas a infecciones del aparato respiratorio y urogenital, además de estudiar estas especies en mujeres infértiles. Por otro lado, los métodos desarrollados permiten realizar investigaciones dirigidas al conocimiento de especies de micoplasmas y ureaplasmas y su papel como patógeno en el hombre.

#### **1.5 Valor teórico**

El presente documento recopila información científica relacionada con el desarrollo de metodologías para el diagnóstico microbiológico de infecciones causadas por especies de micoplasmas y ureaplasmas, además de incluir información teórica relacionada con los métodos moleculares basados en la amplificación de ácidos nucleicos para la detección de estas especies asociadas a enfermedades del tracto respiratorio y urogenital, proporcionando un diagnóstico microbiológico sensible y específico.

Los resultados que integran parte del contenido de este trabajo han recibido los siguientes reconocimientos: Resultados relevantes aprobados por el Consejo Científico del IPK (1996, 2002 y 2004). Resultado Relevante Municipal del XV y XVI Fórum de Ciencia y Técnica (2003 y 2005). Resultado Relevante Provincial del XV y XVI Fórum de Ciencia y Técnica

(2003 y 2005). Además, parte de los resultados obtenidos en esta tesis están publicados en 15 artículos científicos en revistas nacionales e internacionales, también han sido presentados en 11 eventos científicos nacionales e internacionales y han constituido temas de 14 tesis, de Residente de Microbiología del IPK, de Maestrías en Bacteriología-Micología del IPK, de Maestría en Infectología del IPK, de Maestría de Microbiología de la Universidad de La Habana (UH), Trabajos de Diplomas de la Facultad de Biología de la UH y Trabajos de Diplomas del Politécnico “Mártires de Girón”.

### **1.6 Valor práctico**

Los resultados obtenidos mediante el presente trabajo permiten fortalecer el diagnóstico microbiológico en el Laboratorio Nacional de Referencia de Micoplasmas del Instituto “Pedro Kouri”, al disponer de métodos moleculares altamente sensibles y específicos basados en la amplificación de ácidos nucleicos para la detección de especies de micoplasmas y ureaplasmas asociadas a afecciones respiratorias y urogenitales en hombres y mujeres, permitiendo aplicar una adecuada terapia de medicamentos a pacientes con afecciones por estos microorganismos.

## **II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA**

## II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

### 2.1 Generalidades

Los mollicutes son considerados parásitos en el hombre, animales, plantas y cultivos de células. Estos microorganismos se distinguen de los demás procariontes por carecer de pared celular y ser extremadamente sensibles a cambios de pH, temperatura, presión osmótica, rayos ultravioletas, agentes tensoactivos, anticuerpos y complemento, además presentan una marcada resistencia a la acción de antimicrobianos, como  $\beta$ -lactámicos, vancomicina, bacitracina y fosfomicina, que interactúan directamente en la síntesis del peptidoglucano. Estas bacterias muestran diferentes formas en dependencia de la especie, de los constituyentes del medio de cultivo y la fase de crecimiento del cultivo (Waites y Taylor-Robinson, 2007).

### 2.2 Antecedentes históricos

En el año 1898 dos bacteriólogos franceses, E. Nocard y E. Roux, estudiando el líquido pleural de animales enfermos de pleuroneumonía, aislaron un microorganismo que se diferenciaba de las bacterias y virus, nombrándole “Organismo de la Pleuroneumonía” (PPO por sus siglas en inglés). Pasados 25 años, J. Bridge y A. Donnatien, también franceses, cultivaron un nuevo microorganismo asociado a la agalactia en ovejas y cabras

con semejanzas al PPO. Estos descubrimientos estimularon el interés por estos microorganismos y a finales de 1930 comenzaban a conocerse como “Organismo Parecidos al de la Pleuroneumonía” (PPLO por sus siglas en inglés). En Inglaterra, Leingham estudió su morfología, Kleinerberger-Nelson los aisló de roedores, Laidlaw y Elford en el año 1936 descubrieron que no sólo eran especies parásitas, ya que obtuvieron cultivos típicos a partir de material de alcantarillas. Estas observaciones fueron confirmadas por Seiffert en Alemania, cuando aisló gérmenes similares a partir del suelo, abono, deyecciones y hojas en descomposición. En Estados Unidos de América (E.U.A.), Nelson hizo aislamientos de los PPLO en pollos y roedores. Sabin realizó también estudios de un microorganismo similar con propiedades neurotóxicas (Harwick et al., 1972).

En el año 1937, se realizó el primer reporte de aislamiento de un PPLO del aparato urogenital, el microorganismo fue obtenido aparentemente en cultivo puro a partir de un absceso de la glándula de Bartolino. Después, numerosos reportes aparecieron de frecuentes aislamientos de estos gérmenes en el hombre, considerándose muchos patógenos por provenir de pacientes con lesiones, aunque también se encontraron en muestras clínicas de personas sanas, por lo que se pensó que este agente podía ser parte de la microbiota normal (Hayflick y Chanock, 1965).

Por otra parte, la primera descripción de la neumonía atípica primaria en el hombre, como un síndrome clínico, ocurrió a finales del año 1930, con el reconocimiento de que en algunos casos de neumonía fracasaba la terapéutica con sulfas o penicilinas. El pionero en los estudios de esta entidad fue el Dr. Monroe Eaton, quien finalmente en el año 1944, reprodujo experimentalmente la neumonía en ratas y hámsters mediante la inoculación con

muestras de esputo de pacientes infectados, observando que el agente podía ser neutralizado con el suero de pacientes convalecientes y demostró que era filtrable, por lo que inicialmente se pensó que podía ser un virus y se le llamó desde entonces agente Eaton (Hayflick y Chanock, 1965).

En la década de los años 50 del siglo XX se le denominó con el término *Mycoplasma* (del griego *mykes*: hongo y *plasma*: forma) a los microorganismos filtrables y sin pared celular con formas filamentosas y aspectos parecidos a los hongos, conocidos como PPLO (Razin y Hayflick 2010).

Marmion y Goodburn en el año 1961, después de la observación de pequeños cocobacilos en el tejido bronquial de pollos infectados con esputo de pacientes con neumonía atípica primaria, plantearon que el agente Eaton era similar al agente de la pleuroneumonía bovina, y ese mismo año los postulados de Koch se cumplieron para dicho agente, con la transmisión de la enfermedad a voluntarios inoculados con estos microorganismos aislados en el laboratorio (Marmion y Goodburn, 1961). Un año más tarde, en 1962, se logró el crecimiento en un medio artificial y finalmente su reconocimiento oficial en el Instituto Nacional de Salud en E.U.A. Esto provocó, no sólo el estímulo para el estudio de estos gérmenes en el hombre y su patogenicidad, sino también la motivación para realizar investigaciones más profundas para su clasificación y nomenclatura (Hayflick y Chanock, 1965).

En el año 1963, se propuso el nombre *Mycoplasma pneumoniae* para el agente Eaton, y el Comité Internacional de Taxonomía propuso que todos los miembros de esta colección

fueran asignados en el género *Mycoplasma*. Posteriormente comenzaron a aislarse e identificarse nuevos y diferentes microorganismos, por lo que comenzaron a utilizarse nuevos nombres taxonómicos y diferentes niveles de clasificación, apareciendo los géneros *Acholeplasma*, *Ureaplasma*, entre otros; así, después de una rectificación, todos los procariotas carentes de pared celular y filtrables se consideraron dentro de la clase nombrada *Mollicutes*: del latín *Molli*-blando y *cutes*-piel (Edward y Freundt, 1967).

### 2.3 Clasificación taxonómica

La taxonomía de la clase *Mollicutes* está basada en criterios de requerimientos nutritivos, actividades bioquímicas, morfología y características serológicas. Ver Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la clase *Mollicutes* (Brown et al., 2010).

<b>DOMINIO:</b> <i>Eubacteria</i>		
<b>PHYLUM:</b> XVI <i>Tenericutes</i>		
<b>CLASE I:</b> <i>Mollicutes</i>		
<b>ORDEN I:</b> <i>Mycoplasmatales</i>	<b>Familia I:</b> <i>Mycoplasmataceae</i>	<b>Género I:</b> <i>Mycoplasma</i> <b>Género II:</b> <i>Eperythrozoon</i> <b>Género III:</b> <i>Haemobartorella</i> <b>Género IV:</b> <i>Ureaplasma</i>
<b>ORDEN II:</b> <i>Entomoplasmatales</i>	<b>Familia I:</b> <i>Entomoplasmataceae</i>	<b>Género I:</b> <i>Entomoplasma</i> <b>Género II:</b> <i>Mesoplasma</i>
	<b>Familia II:</b> <i>Spiroplasmataceae</i>	<b>Género I:</b> <i>Spiroplasma</i>
<b>ORDEN III:</b> <i>Acholeplasmatales</i>	<b>Familia I:</b> <i>Acholeplasmataceae</i>	<b>Género I:</b> <i>Acholeplasma</i>
<b>ORDEN IV:</b> <i>Anaeroplasmatales</i>	<b>Familia I:</b> <i>Anaeroplasmataceae</i>	<b>Género I:</b> <i>Anaeroplasma</i> <b>Género II:</b> <i>Asteroleplasma</i>
<b>ORDEN V:</b> <i>Incertae sedis</i>	<b>Familia I:</b> <i>Erysipelotrichaceae</i>	<b>Género I:</b> <i>Erysipelothrix</i> <b>Género II:</b> <i>Bulleidia</i> <b>Género III:</b> <i>Holdemania</i> <b>Género IV:</b> <i>Solobacterium</i>

El término micoplasmas o mollicutes ha sido intercambiado desde hace tiempo para nombrar cualquier especie incluida en la clase *Mollicutes*.

En la familia *Mycoplasmataceae*, los géneros *Mycoplasma* y *Ureaplasma* presentan gran importancia por encontrarse asociados a enfermedades en el hombre y animales (Garrity et al., 2007), y en la familia *Acholeplasmataceae*, con el género *Acholeplasma*, las especies *A. laidlawii* y *A. oculi* han sido encontradas formando parte de la microbiota normal de hombre (Waites y Taylor- Robinson, 2007).

El género *Mycoplasma* cuenta con alrededor de 125 especies, de ellas 14 son de origen humano. Las especies con mayor importancia clínica son: *M. hominis*, *M. genitalium*, *M. pneumoniae* y *M. fermentans* (Pérez y Almanza, 2001; Waites y Taylor - Robinson, 2007).

En el género *Ureaplasma* se agrupan siete especies, de las cuales solamente dos son relevantes desde el punto de vista médico: *U. urealyticum* con diez serovares (serovar 2, 4, 5, 7 y 13) y *U. parvum* con cuatro serovares (serovar 1, 3, 6 y 14) (Kong et al., 1999). La diferenciación de ambas especies solo se logra mediante técnicas serológicas y moleculares, puesto que sus características culturales y bioquímica-fisiológicas son idénticas (Kong et al., 2000).

#### **2.4 Morfología y características fisiológicas**

Los miembros de la familia *Mycoplasmataceae* se distinguen por presentar características morfológicas y fisiológicas propias. Las células de los micoplasmas al carecer de pared

celular, presentan una membrana citoplasmática trilaminar rica en esteroides (Brooks et al., 2007); esto le confiere a los micoplasmas una gran sensibilidad a las variaciones de presión osmótica, acción de solventes orgánicos, alcoholes de cadena larga y otros agentes que afecten la composición de la membrana celular e induzcan a la célula a un choque osmótico (Fletcher et al., 1981; Brooks et al., 2007).

Los micoplasmas presentan una morfología celular pleomórfica condicionada por la ausencia de pared celular. En condiciones ambientales favorables o en las fases tempranas del cultivo, las formas celulares esféricas de 0,3  $\mu\text{m}$  de diámetro son las predominantes (Robertson et al., 1975). Cuando las condiciones ambientales no son las óptimas o el cultivo ha envejecido, comienzan a aparecer formas cilíndricas (100  $\mu\text{m}$  de largo, 0,4  $\mu\text{m}$  de ancho), que contienen varios nucleoides (Razin, 1981). Estas estructuras fibrilares se fragmentan y dan origen a estructuras esféricas de 0,1 a 0,25  $\mu\text{m}$ , denominadas “cuerpos elementales”, que en su mayoría carecen de viabilidad. Cuando estas estructuras son reinoculadas en un medio fresco, algunas son capaces de crecer y multiplicarse, dando origen nuevamente a células esféricas (Robertson et al., 1975; Brown et al., 2007).

La presencia de esteroides en la membrana de las células de estos microorganismos y su incapacidad de biosíntesis de los mismos, condiciona uno de sus requerimientos nutricionales más relevante, el requerimiento de colesterol para su crecimiento y desarrollo, el cual debe estar incorporado en los medios de cultivo libres de células (Razin y Tully, 1970).

Además de ser incapaces de sintetizar esteroides, los micoplasmas carecen de las vías biosintéticas necesarias para la síntesis de ácidos grasos y precursores de los ácidos nucleicos (Brooks et al., 2007); es por ello que en su mayoría se presentan como parásitos de organismos eucarióticos asociados a la membrana, tanto a la célula como a los orgánulos citoplasmáticos (Dallo et al., 2000; Rottem, 2003).

La mayoría de los micoplasmas pueden utilizar glucosa y otros carbohidratos sencillos como fuente de energía mediante la vía glicolítica Embden-Meyerhof-Parnas. En el caso de los micoplasmas no fermentadores de carbohidratos otras vías metabólicas han sido planteadas, aunque la más universal es la de obtención de trifosfato de adenosina (ATP) mediante la hidrólisis de la arginina. Por esta vía la arginina es convertida en citrulina por la enzima arginina diaminasa, seguidamente la citrulina es transformada a ornitina y carbamoilfosfato mediante la ornitina carbamoil transferasa y finalmente el carbamoilfosfato es hidrolizado en amonio y dióxido de carbono mediante la carbatoquinasa, con la consecuente producción de ATP y un aumento del pH del medio (Razin, 1981; Miles et al., 1994; Pollack et al., 1996).

*Ureaplasma* spp. es el único organismo vivo que requiere urea como fuente de carbono en su metabolismo. Esta característica viene dada por ser microorganismos no glicolíticos y carentes de arginina diaminasa, por lo que la obtención de ATP ocurre mediante el establecimiento de un gradiente electrostático generado por el amonio liberado durante la degradación intracelular de la urea (Razin, 1983; Brown et al., 2007).

## 2.5 Características culturales de los micoplasmas

Los micoplasmas son microorganismos muy exigentes desde el punto de vista nutricional. Sus requerimientos culturales son muy altos y generalmente crecen de forma idónea en cultivos de células de mamíferos (Brooks et al., 2007).

La mayoría de los micoplasmas patógenos se desarrollan en medios libres de células, aunque algunas especies, como *M. genitalium*, no son capaces de desarrollarse o multiplicarse en estos tipos de medios o requieren de un período largo para su crecimiento (Jensen et al., 1996; Jensen, 2006; Baseman et al., 2004; Blaylock et al., 2004); por lo que para el cultivo de estos microorganismos se requieren medios altamente nutritivos, que le brinden a la célula todos los cofactores enzimáticos necesarios para el desarrollo de las funciones metabólicas básicas (Pérez y Almanza, 2001; Brooks et al., 2007). En la elaboración de los medios de cultivo pueden ser utilizados generalmente como base nutritiva los medios comunes en el laboratorio, como Agar Triptona Soja, Caldo de Cerebro y Corazón, aunque la base recomendada para el cultivo de estos microorganismos es el medio PPLO (Shepard, 1983). Los medios de cultivo se elaboran adicionándole a la base nutritiva los diferentes suplementos y el suero fresco de caballo, siendo este último la fuente de colesterol requerida para el desarrollo de los micoplasmas (Brooks et al., 2007).

Atendiendo a la utilización de determinados compuestos como fuente de energía y carbono, los micoplasmas se pueden clasificar en tres grupos (Velleca et al., 1980; Brown et al., 2007):

- Grupo de los fermentadores: utilizan la glucosa como fuente de carbono y energía, dando como productos finales ácido láctico y CO<sub>2</sub>, lo cual causa una disminución del pH del medio de cultivo. Ej. *M. pneumoniae* y *M. fermentans*.
- Grupo de los hidrolizadores de la arginina: utilizan la hidrólisis de este aminoácido como fuente de carbono y ATP, como producto final amonio, que se disuelve en el medio aumentando el pH, hasta valores superiores a 7,5. Ej. *M. orale*, *M. hominis* y *M. lipophilium*.
- Grupo de urea-dependiente: dependen de la hidrólisis de la urea como única fuente de carbono y energía, y como metabolito final se libera gran cantidad de amonio, el cual provoca un rápido aumento del pH del medio, incluso en menos de 24 horas. Ej. *U. urealyticum* y *U. parvum*.

Los micoplasmas requieren una atmósfera propia para su desarrollo en condiciones de cultivo in vitro, exceptuando a las especies del género *Ureaplasma*, las cuales se desarrollan en una atmósfera de 10 - 20% de CO<sub>2</sub> y 80 - 90% de N<sub>2</sub>, mientras que las demás requieren sólo de 5 - 10% de CO<sub>2</sub> y 90 - 95% de N<sub>2</sub> en microaerofilia (Robertson, 1982; Pérez y Almanza, 2001). Dado sus características fisiológicas, cada género de la familia *Mycoplasmataceae* se desarrolla a un pH específico. Las especies del género *Mycoplasma* se desarrollan en un pH entre 7,0 - 7,8 y las del género *Ureaplasma* entre 6,0 - 6,2 (Waites y Taylor–Robinson, 2007). Estas diferencias fisiológicas y su pH es regulado en dependencia de la especie que se desea aislar. De forma rutinaria se utilizan los medios en estado líquido y sólido descritos por Bolske, 1988, conocidos por las letras “F” y “UN”. El medio F propicia el desarrollo de las especies del género *Mycoplasma*, puesto que su pH oscila entre 7,0 – 7,45, mientras que las especies del género *Ureaplasma* son aisladas en el medio UN con un pH regulado a 6,0 – 6,2 (Shepard, 1983; Bolske, 1988). Otros medios se

utilizan para el cultivo de micoplasmas patógenos como el SP4, agar A7 y A8 (Waites et al., 2005). Los mismos contienen los requerimientos nutricionales universales de todos los micoplasmas, por lo que pueden ser utilizados indistintamente para el cultivo de ambos géneros (Shepard et al., 1976; Brown et al., 2007; Brown, 2010).

Las colonias de los micoplasmas son pequeñas (0,02 – 0,5 mm de diámetro), con el centro granuloso y embebido en el agar, recordando la apariencia de un “huevo frito” (Razin, 1983). Las colonias de *U. urealyticum* son de un tamaño más pequeño (0,01 a 0,5 mm), lo que explica su nombre original de cepas T (del inglés *tiny*: pequeño), de color carmelita con un centro oscuro opaco y muy poco crecimiento periférico, semejantes a "erizo de mar" cuando son teñidas con solución de urea con sulfato o cloruro de manganeso, por lo que las mismas para ser observadas requieren un mejor poder de resolución del microscopio (Shepard et al., 1976; Waites y Taylor–Robinson, 2007).

## **2.6 Biología molecular y filogenia de la clase *Mollicutes***

Los miembros de la clase *Mollicutes* son los microorganismos procarióticos más pequeños capaces de autoreplicarse, conteniendo la información genética mínima esencial para el desarrollo de la vida (Razin, 1985; Glass et al., 2006). El genoma circular de doble cadena de estos microorganismos, con una talla promedio de 500 MDa en los géneros *Mycoplasma* y *Ureaplasma*, se caracteriza por su bajo contenido de guanina mas citocina (G + C) que oscila entre el 24 - 40 % (Garrity et al., 2007). La replicación del material genético ocurre de forma similar a otros procariontes, reconociéndose un solo sitio de iniciación y otro de terminación a lo largo del cromosoma bacteriano (Razin, 1985; Fadiel et al., 2007).

Los ribosomas de estos microorganismos presentan las características típicas de las eubacterias, con un coeficiente de sedimentación de 70S, tres ARN ribosomal (ARNr 5S, 16S y 23S), alrededor de 50 proteínas, las cuales presentan un perfil físico-químico similar a las proteínas ribosómicas de los bacilos Gram positivos. Este comportamiento está dado por el alto grado de conservación que poseen los genes de las proteínas ribosómicas en el genoma de los micoplasmas, sin importar la pequeña capacidad genética del mismo (Razin, 1985).

Los genes mejor caracterizados en la clase *Mollicutes* son los del ARNr, lo cual se explica por varias razones: 1- los genes del ARNr y sus productos están muy conservados, lo cual los convierte en excelentes marcadores para estudios de filogenia. 2- La selección y amplificación de los mismos es relativamente fácil. 3- La amplificación de los genes ribosomales sirve como prueba de detección e identificación de los micoplasmas en muestras clínicas. 4- El hecho de que estos genes no se encuentren repetidos en el genoma, permite su utilización para estudios de mecanismos de control de síntesis de los ARNr (Razin et al., 1998).

Otros genes, como los ARN de transferencia (ARNt) han sido estudiados y caracterizados para su empleo en la identificación de especies de micoplasmas (Stakenborg et al., 2005). En el genoma de los micoplasmas, los ARNt presentan un alto contenido en G + C de 50 % y se ha demostrado que en algunos micoplasmas un mismo ARNt es común para más de tres aminoácidos diferentes (ARNt isoaceptores) de forma similar a los ARNt de las mitocondrias (Razin, 1985). Ambos genes de ARNt (mitocondrial y de micoplasma) han evolucionado como consecuencia de simplificación del genoma primario, hacia la

eliminación de la síntesis de elementos no esenciales y un aumento en la economía celular en cuanto a número de moléculas y funciones de las mismas (Razin, 1985).

La secuenciación de los genes, tanto del ARNr, ARNt, proteínas estructurales y genes de enzimas claves en el metabolismo de los micoplasmas, han brindado una información útil a la hora de establecer las relaciones filogénicas de estos microorganismos (Rocha y Blanchard, 2002). El modelo filogénico más aceptado en la actualidad, establece como antecesores de los micoplasmas a microorganismos del género *Clostridium*, los cuales eventualmente perdieron la pared celular y sufrieron una reducción del genoma (Razin, 1985). Algunos miembros de la clase perdieron los genes de las enzimas de vías biosintéticas claves para el desarrollo del metabolismo de lípidos y ácidos nucleicos, por lo que comenzaron a evolucionar como simbioses de otros organismos (Brock y Madigan, 2001).

### **2.7 Atributos patogénicos asociados a micoplasmas**

La patogenicidad de los micoplasmas se asocia con un conjunto de atributos o características patogénicas que le permiten a los micoplasmas colonizar, parasitar y persistir en las células y tejidos del huésped. Los mollicutes son los primeros microorganismos asociados a las mucosas del tracto respiratorio y genitourinario, en íntima asociación con las células epiteliales (Waites et al., 2005). En varias especies, particularmente en *M. fermentans*, *M. penetrans*, *M. genitalium* y en algunos casos *M. pneumoniae* y *M. hominis*, la invasión a la célula hospedera ocurre y el microorganismo reside intracelularmente (Taylor-Robinson et al., 1991). Otras especies como *M. penetrans*

infectan a la célula localizándose en el citoplasma y en la región perinuclear (Girón et al., 1996). Mediante este mecanismo, los micoplasmas evaden la respuesta inmune del hospedero, lo que contribuye a la persistencia del microorganismo y a la cronicidad de la infección (Baseman et al., 1995; Cassell et al., 2001; Waites et al., 2005).

El primer paso en la colonización e infección de la célula hospedera por los micoplasmas es la localización y citoadherencia (Rottem, 2003). Tanto *Mycoplasma* spp. como *Ureaplasma* spp., son capaces de reconocer y unirse a varios tipos de células humanas, entre las que se encuentran eritrocitos, espermatozoides y células epiteliales. En estos microorganismos la citoadherencia es el principal factor de virulencia. Los mutantes adherentes - deficientes carecen de virulencia (Razin y Jacobs, 1992).

La unión a las membranas celulares ocurre mediante un conjunto de estructuras proteicas que conforman el organelo de adhesión celular (Su et al., 2007). Esta estructura está formada por un cuerpo electrodensito compuesto por un grupo de fosfoproteínas de reconocimiento y unión a receptores celulares que se polimerizan, formando estructuras fibrilares que se extienden lateralmente hacia el centro de la célula microbiana (Rottem, 2003).

Las principales proteínas involucradas en el proceso de adhesión, penetración y fusión de membranas que forman este organelo han sido aisladas y purificadas a partir de la membrana de *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *M. hominis* y *Ureaplasma* spp. (Waites et al., 2005; Su et al., 2007).

Los micoplasmas capaces de fusionarse, como los que solo se comportan como parásitos extracelulares, presentan un conjunto de mecanismos para desarrollarse a expensas de las células vivas y causan daño celular al hospedero. Entre estos mecanismos encontramos la competencia por precursores biosintéticos esenciales, daño por citoadherencia, por fusión, efectos citopáticos y mutaciones (Rottem, 2003).

Durante el proceso de fusión entre los micoplasmas y la membrana plasmática de la célula huésped, los componentes citosólicos del microorganismo son descargados en el interior de la misma. Dentro de estos componentes se encuentran una gran cantidad de enzimas hidrolíticas que atacan y degradan los componentes celulares. Las más notables de esta batería enzimática son las nucleasas, las que hidrolizan rápidamente los ácidos nucleicos celulares, liberando los precursores requeridos para la replicación y síntesis de los mismos en la célula microbiana (Razin et al., 1998). Los efectos citopáticos están dados por una vacuolización y reorganización del citoesqueleto, causado por la internalización y multiplicación en el citosol u organelos celulares de los micoplasmas. Esta vacuolización puede estar dada por la producción de peróxidos orgánicos, puesto que algunos agentes antioxidantes como el  $\alpha$ -tocoferol evitan la aparición de este efecto citopático (Borovsky et al., 1998; Maniloff, 2002).

La interacción prolongada entre los micoplasmas y la célula huésped puede inducir a una inestabilidad cromosómica que debuta en algunos casos en transformación maligna del tejido parasitado, promoviendo el crecimiento de tumores (Tsai et al., 1995; Yang et al., 2010). Las variaciones del cariotipo celular y las aberraciones cromosómicas en algunas células, son el resultado del secuestro de arginina por micoplasmas, puestos que las

histonas son proteínas ricas en este aminoácido (McGarrity et al., 1992). La expresión de algunos oncogenes ha sido encontrada en las etapas iniciales, tanto en la etapa reversible como irreversible de la transformación mediada por micoplasmas de las células animales (Rottem, 2003).

La producción de proteasas por los micoplasmas, tiene un papel fundamental en el proceso de colonización y persistencia de la enfermedad, mediante la evasión de la respuesta inmune mucosal. La principal enzima de este tipo es la IgA1-proteasa, una serina proteasa, que hidroliza a la IgA de las mucosas, lo que constituye una forma de evitar la eliminación de los microorganismos por opsonización (Waites et al., 2005).

Otras enzimas como las fosfolipasas A y C han sido caracterizadas en *Ureaplasma* spp. y comprobado su efecto sobre la inducción prematura del parto. La acción de estas enzimas sobre los fosfolípidos celulares libera cantidad suficiente de ácido araquidónico y altera la síntesis de prostaglandinas, lo cual desencadena una cascada de señales bioquímicas que inician las contracciones del útero en mujeres embarazadas y por ende el comienzo de la labor de parto (De Silva y Quinn, 1991; De Silva y Quinn, 1999; Goldenberg et al., 2008).

La inmunomodulación constituye otro mecanismo patogénico mediante el cual los micoplasmas causan daño al huésped. Estos microorganismos son considerados superantígenos, siendo capaces de activar una gran parte de la población de linfocitos T periféricos sin necesidad de llevarse a cabo el procesamiento del antígeno por las células presentadoras de antígenos (APC del inglés Antigen Presenting Cell) (Razin et al., 1998; Waites et al., 2005). Esta activación es mediada solo por el complejo mayor de

histocompatibilidad clase II (MHC II del inglés Major Histocompatibility Complex Class II) y la región variable de la cadena  $\beta$  del Receptor de Células T (TCR del inglés T Cell Receptor) (Rottem, 2003).

Uno de los mecanismos de inmunomodulación mejor documentados, es la inducción de la producción de citoquinas o modulinas por los monocitos. Los agentes desencadenantes de este mecanismo son las lipoproteínas de la membrana plasmática microbiana, estas lipoproteínas se unen a los receptores tipo *Toll* (TRL del inglés Toll-like Receptors) de la célula huésped, los que traducen la señal y activan la expresión del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, el cual tiene sitios de unión en la región 5' de los genes que codifican para citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y IL-6), induciendo la transcripción de los mismos (Wu et al., 2008). Estas modulinas reclutan hacia el sitio de infección primaria una gran cantidad de neutrófilos, causando la infiltración e inflamación del tejido, contribuyendo a la patogénesis de la enfermedad y al daño tisular, ocasionado por la infección de *M. genitalium* (Wu et al., 2008).

El NF- $\kappa$ B también influye sobre las células inmunológicas regulando o modulando la muerte celular programada de las mismas de dos formas diferentes: por inhibición de la apoptosis o aceleración de la misma (Rottem, 2003; Wu et al., 2008). La inducción prematura de la apoptosis de un gran número de células durante la infección primaria de los micoplasmas, contribuye de manera significativa a la expansión y diseminación del microorganismo en el tejido parasitado (Wu et al., 2008).

## 2.8 Infecciones de micoplasmas asociadas a enfermedades

Según el sitio de colonización primaria, las 16 especies de micoplasmas de origen humano, pueden clasificarse en micoplasmas respiratorios y micoplasmas urogenitales, independientemente del tejido u órgano al que puedan afectar (Waites et al., 2005).

Dentro del grupo de micoplasmas respiratorios considerados como parte de la microbiota normal de la orofaringe se reconocen a *M. salivarium* con una incidencia entre 60 y 80% en la cavidad oral en los adultos y *M. orale* entre 30 y 60% en la orofaringe también de adultos, *M. buccale*, *M. faucium* y *M. lipophilum* son otras especies de la microbiota normal de la orofaringe pero con menor frecuencia. *M. pneumoniae* es la especie de mayor importancia, reconocida como el agente etiológico de la neumonía atípica primaria, es causa del 30% de las neumonías adquiridas en la comunidad, con predominio de bronquitis, también esta especie esta asociada a faringitis, miringitis, asma bronquial y enfermedades extra pulmonares (Waites et al., 2005).

Como micoplasmas urogenitales se reconocen a *M. hominis*, *M. genitalium*, *U. parvum* y *U. urealyticum*, las que se asocian a enfermedades genitourinarias en pacientes inmunocompetentes, aunque en pacientes inmunocomprometidos estas especies también pueden causar enfermedades genitourinaria y extra genitourinaria (Arya et al., 2001; Manhart y Kay, 2010; Pascual et al., 2010). Otras especies son *M. fermentans* y *M. penetrans* que han sido encontradas como patógenos oportunistas en pacientes inmunocomprometidos (Waites et al., 2005). *M. pirum* solamente ha sido reportado como

patógeno de células del sistema inmune en pacientes infectados con el VIH, siendo un agente desencadenante del sida (Montagnier y Blanchard, 1993).

Los micoplasmas urogenitales son capaces de producir un gran número de enfermedades en los distintos órganos. Las principales enfermedades causadas por estos microorganismos en el tracto genitourinario incluyen procesos tales como: pielonefritis, uretritis no gonocócica, vaginosis bacteriana, cervicitis, enfermedad pélvica inflamatoria, además de infertilidad, corioamnionitis, aborto espontáneo y parto prematuro (Schlicht et al., 2004; Waites et al., 2005; Shu et al., 2011).

La colonización del epitelio vaginal por *M. hominis* debe ser por debajo de  $10^4$  UCC/mL y de *U. urealyticum* por debajo de  $10^3$  UCC/mL para ser consideradas microbiota vaginal normal, donde el pH se mantiene por debajo de 4 por el predominio de lactobacillus. Sin embargo, por múltiples factores aún no bien esclarecidos, puede ocurrir un desequilibrio en la microbiota vaginal con aumento del pH, lo que favorece la multiplicación exacerbada de diferentes microorganismos, entre ellos *M. hominis* y *U. urealyticum* que elevan sus concentraciones por encima de las antes mencionadas, y hacen que lleguen a las partes altas del tracto genital femenino, principalmente al endocervix y cavidad pelviana, pudiendo causar enfermedades, abortos, partos prematuros, además de infertilidad cervical y tubárica (Carey et al., 1991; Hillier y Holmes, 1999; Yoon et al., 2003).

Estudios recientes han demostrado que *U. urealyticum* es capaz de infectar a los espermatozoides, disminuyendo su movilidad. La eliminación de este microorganismo mediante terapia antimicrobiana ha sido bien correlacionada con un aumento o mejora de la

calidad del semen (Waites et al., 2005). La infección por *M. hominis* y *M. genitalium* ha sido bien correlacionada con la disminución de las variables normales del semen en hombres infértiles (Gdoura et al., 2007).

*M. hominis* se ha encontrado que es capaz de multiplicarse dentro de trofozoitos de *Trichomonas vaginalis*, lo cual le permite a este micoplasma evadir la respuesta inmunitaria de la mucosa vaginal y permite explicar la capacidad de estos microorganismos de sobrevivir a las condiciones adversas que representa el epitelio vaginal (pH bajo, condiciones de anaerobiosis desfavorables, microbiota normal protectora, tratamientos antibióticos). Este comportamiento sugiere que, *T. vaginalis* juega un papel importante en la transmisión de *M. hominis*, siendo el primer caso reportado de simbiosis entre dos parásitos humanos obligados (Van der Shee et al., 2001; Dessi et al., 2005).

Estudio sobre infección de micoplasmas urogenitales y coinfección con el Virus del Papiloma Humano (VPH), han demostrado que la infección por micoplasmas facilita la infección del VPH, lo que incrementa el riesgo del daño cervical patológico, siendo este una de las causas de infertilidad en la mujer (Denks, 2007; Zhang et al., 2010).

Otras enfermedades extragenitales, también pueden ser causadas por este grupo de micoplasmas urogenitales, entre las que se encuentran neumonías, artritis séptica, meningitis, bacteriemias y endocarditis, además de infecciones de la piel y del sistema inmune (Waites et al., 2005; Geißdorfer et al., 2008).

## **2.9 Diagnóstico microbiológico de las infecciones causadas por micoplasmas**

**- Métodos bacteriológicos**

El cultivo bacteriológico es la “prueba de oro” en el diagnóstico de las infecciones por micoplasmas. Sin embargo, dada la fragilidad fisiológica de los micoplasmas y su poca tolerancia a los factores ambientales, junto a su alto requerimiento nutricional, hacen que los métodos bacteriológicos requieran de atenciones y procedimientos especiales, que incluyen cultivo en medios selectivos, aislamiento de cepas y la identificación por métodos bioquímicos y serológicos (Deutschmann et al., 2010).

El aislamiento en cultivo puro incluye una etapa primaria, denominada cultivo primario, precultivo o enriquecimiento, donde se utilizan medios de cultivo líquido selectivos para los géneros *Mycoplasma* y *Ureaplasma*. El crecimiento se comprueba por un cambio en el indicador de pH del medio, pues por su pequeño tamaño, los micoplasmas no producen enturbiamiento del medio (Velleca et al., 1980; Bolske, 1988).

La obtención del cultivo puro se lleva a cabo mediante la re-inoculación en medio líquido y la inoculación en medio sólido, esta última se realiza en condiciones de microaerofilia, generalmente por el método de la vela a 37°C y por un período que puede variar desde dos días hasta dos semanas para visualizar las colonias (Robertson, 1982).

Las colonias de micoplasmas presentan una morfología característica para cada uno de los géneros, aunque la visualización de las mismas generalmente requiere de procedimientos especiales de tinción para ser visualizadas mediante un estereoscopio o microscopio óptico. En el caso de las especies de micoplasmas se utiliza la tinción de Dienes para la

identificación de las colonias presuntivamente clasificadas como tales, puesto que solo las colonias de este género son capaces de retener la tinción del coloante de Dienes por más de 30 min., mientras que las colonias de ureaplasmas son detectadas mediante la adición de la solución de cloruro de manganeso y urea, esta solución permite que se deposite una película de dióxido de manganeso sobre las colonias de ureaplasmas, como resultado de la reacción del amonio liberado a partir de la acción de la ureasa celular sobre la urea y el cloruro de manganeso, mostrando una apariencia de “erizo de mar” de un color marrón oscuro a las mismas (Velleca et al., 1980; Razin, 1983<sub>b</sub>).

El número de pruebas bioquímicas para detectar la actividad enzimática de los micoplasmas es relativamente pequeña, pero a pesar de esto, constituye una parte significativa de la base para la diferenciación de los mollicutes en familias y géneros, y en muchos casos puede ayudar a definir el nivel de especie. De forma rutinaria se evalúa la capacidad de hidrolizar la arginina, fermentación de la glucosa, hidrólisis de urea y la inhibición del crecimiento por digitonina de la forma siguiente:

- Hidrólisis de la arginina: Este ensayo permite diferenciar a los micoplasmas que utilizan este aminoácido, principalmente *M. hominis*, *M. fermentans* y *M. penetrans*, mediante un cambio de color del medio. Se fundamenta en la característica fisiológica de estos microorganismos de producir ATP a expensas de la hidrólisis de este aminoácido y la consecuente liberación de amonio, lo que causa un aumento del pH del medio y el viraje del indicador (Barile, 1983).
- Fermentación de azúcares: Algunas especies de micoplasmas de interés para el hombre, como *M. pneumoniae*, son capaces de metabolizar azúcares, más específicamente la glucosa mediante la vía fermentativa. La técnica se basa en la

demostración de disminución del pH durante el crecimiento de los microorganismos en presencia de glucosa en el medio de cultivo o más directamente en la medición de la desaparición de la glucosa o en la determinación de los productos ácidos o de la actividad hexoquinasa (Razin y Cirillo, 1983).

- Inhibición del crecimiento por la digitonina: el ensayo para establecer los requerimientos de esterol constituye un elemento esencial en la identificación y descripción taxonómica de los mollicutes. Mediante este ensayo pueden identificarse *Acholeplasma* y *Mesoplasma*, que no requieren colesterol para su desarrollo, mientras los demás mollicutes si lo necesitan. Esta prueba está fundamentada en la evidencia de inhibición del crecimiento por la digitonina, sustancia que interactúa con el colesterol del medio de cultivo y no permite su asimilación por los microorganismos que lo requieren como factor nutritivo esencial (Tully, 1983).

#### - Métodos serológicos

Las técnicas serológicas tradicionales utilizadas para el diagnóstico de otras enfermedades infecciosas, son poco útiles para la detección de micoplasmas, sobre todo de los que se encuentran en el tracto genital, ya que estos microorganismos son capaces de desarrollarse en personas sanas formando parte de la microbiota normal (Waites et al., 2005). La detección de *M. hominis*, *M. genitalium* y *Ureaplasma* spp. por métodos de microinmunofluorescencia, inhibición del metabolismo por antisueros específicos y ELISA (del inglés Enzyme-linked Immunosorbent Assay) han sido desarrollados con fines investigativos, pero ninguno ha sido comercializado para su utilización rutinaria en el diagnóstico microbiológico. Diversos sistemas serológicos son reportados para el diagnóstico de *M. pneumoniae* basados en la detección de IgM, sin embargo los resultados son cuestionados, pues los niveles alcanzados de estos anticuerpos en la fase aguda de la

enfermedad son similares a los de la fase convaleciente, y por otra parte, cuando ocurre una reinfección no hay aumento de niveles de anticuerpos (Waites et al., 2005).

### **- Métodos moleculares**

El advenimiento de los métodos moleculares ha permitido un rápido avance en las investigaciones biológicas y en especial microbiológicas. La implementación de métodos moleculares más sensibles y eficientes permite lograr un incremento de la sensibilidad, especificidad y rapidez del diagnóstico microbiológico. La Micoplasmología Clínica, como rama de la Microbiología Médica, también se ha visto beneficiada con el uso de estos métodos moleculares (Louie et al., 2000; Mallard et al., 2005).

Dentro de los métodos moleculares uno de los más utilizados es la amplificación del ADN por la PCR, aún cuando presenta algunos requisitos para su implementación, se considera una herramienta superior al cultivo bacteriológico o la serología para el diagnóstico de infecciones causadas por micoplasmas. La utilización de la PCR no solo está dada en la elevada sensibilidad de la misma para detectar la presencia de micoplasmas en determinada muestra clínica, sino también permite la identificación y clasificación de especies en un breve período de tiempo. Actualmente, según la Organización Internacional de Micoplasmología para la clasificación y caracterización de los aislamientos de micoplasmas resulta un requisito indispensable la aplicación de técnicas moleculares, principalmente de la PCR, combinada a una batería de pruebas fenotípicas que permitan la identificación inequívoca de especies. La PCR ha sido además empleada para la identificación y detección

de marcadores moleculares de resistencia antimicrobiana, marcadores de patogenicidad y marcadores inmunológicos (Stellrecht et al., 2004; Nilsson et al., 2008).

La PCR es una técnica enzimática termo controlada, mediante la cual un fragmento de ADN es amplificado varias veces hasta lograr aproximadamente un millón de copias. La talla del fragmento amplificado en pares de base (pb) depende de los cebadores o *primers* empleados. Estos últimos no son más que secuencias cortas de ADN (oligonucleótidos) definidos por el investigador en dependencia del fragmento de interés a amplificar y que sirven como iniciadores de la reacción al ser utilizados por la enzima ADN polimerasa como punto de partida de la elongación de la nueva cadena de ADN a formarse (Saiki et al., 1985; Sambrook et al., 1989<sub>a</sub>; Bacich, 2011)

Diversas son las variantes del método de la PCR que son aplicadas en el diagnóstico de infecciones por micoplasmas, entre las que se reportan la PCR cualitativa (PCRc) para un amplificar fragmento específico, la PCR-Anidada y PCR-Semianidada para amplificar un fragmento menor a partir de uno previamente amplificado, la PCR-Múltiple para la identificación conjunta de diferentes especies de micoplasmas, PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (PCRq) para la detección y cuantificación de microorganismos en cultivos y muestras clínicas (Knox y Timms, 1998; Stellrecht et al., 2004; Svenstrup et al., 2005).

En la actualidad han sido desarrolladas PCR para la detección e identificación de todas las especies de micoplasmas que infectan al hombre. Los genes más empleados como diana han sido los del ARN ribosomal y sus secuencias espaciadoras, proteínas de adhesión y

otros marcadores de patogenicidad. La especificidad y sensibilidad de cada ensayo depende del gen escogido y el tipo de muestra (Espy et al., 2006; Kim et al., 2011).

Basado en las diferentes regiones del ARNr 16S: Universales, Semivariables y Variables, han sido diseñados diferentes juegos de cebadores para la detección o identificación de la clase, la familia, el género y la especie. En la detección o identificación de la clase *Mollicutes* se utilizan cebadores diseñados a partir de algunas de las regiones universales del ARNr 16S, mientras que la identificación de las especies se utilizan cebadores complementarios a las regiones semivariables y variables (Johansson, 1995).

Aunque el gen del ARNr 16S permite la identificación de las especies de micoplasmas de origen humano, otros genes también han sido empleados, entre ellos el gen de la ureasa y el de la proteína Multi-Banda en *Ureaplasma*, el de la proteína de adhesión de *M. genitalium* y el gen del ARNt para diferentes especies de micoplasmas, además la región espaciadora entre el gen del ARNr 16S y el 23S reportado por su variabilidad entre especies de micoplasmas (Teng et al., 1994; Kong et al., 2000; Lee et al., 2007). En algunas ocasiones esto se sustenta por el hecho de aumentar la sensibilidad del método, puesto que aquellas PCR que utilizan como diana genes con un número mayor de copias en el genoma de los micoplasmas, resultan mucho más sensibles que las basadas en el ARNr 16S, el cual se encuentra en un número reducido de copias (1 – 3 copias/genoma). Otros diseños de PCR utilizan genes constitutivos propios del género en cuestión, pero que presentan una marcada diferencia entre las secuencias nucleotídica de las especies en sí (Colaizy et al., 2003; Waites et al., 2005; Wetmore et al., 2011).

En general el método de la PCR debe realizarse con extremo cuidado para evitar contaminaciones o que el ADN se degrade, siendo necesario realizar la PCR en una zona o área destinada solo a la preparación de mezcla de reacción de la PCR, que debe estar físicamente separada del área de extracción del ADN y del área de electroforesis (zona blanca, zona gris y zona negra, respectivamente). Durante todo el trabajo de biología molecular (extracción del ADN, la PCR y la electroforesis) debe trabajarse utilizando medios de protección personal, principalmente guantes y bata, con el objetivo primario de proteger a la muestra de las nucleasas de cuerpo humano o cualquier microorganismos presente en la ropa o manos del investigador. Debe evitarse hablar durante cualquiera de las etapas de preparación y comprobación de la PCR, puesto que en la cavidad bucal existen especies de micoplasmas que pueden falsear los resultados, junto a las DNAsas salivales que pueden degradar el ADN de la muestra o el ADN ya amplificado (Roche, 2005; Bacich, 2011).

Al comparar la PCR con el cultivo bacteriológico se obtiene que esta técnica es más sensible, específica y rápida en la mayoría de los casos; pues con una correcta estandarización puede ser detectada hasta una copia de genoma/ $\mu\text{L}$  de reacción de la PCR, lo que avala el empleo de esta técnica en la detección y diagnóstico de aquellas especies de difícil aislamiento. Sin embargo, el cultivo bacteriológico, con los requerimientos nutricionales y condiciones óptimas para la viabilidad y multiplicación de los micoplasmas tiene la mayor ventaja, pues permite la multiplicación de toda célula viable presente en la muestra clínica y la posibilidad del aislamiento de la cepa (Stellrecht et al., 2004)

Otros métodos moleculares son la hibridación ADN-ADN, microarreglos, estudios de cortes con enzimas de restricción y secuenciación de genes, estandarizadas para la detección, identificación y clasificación de los taxones de la clase *Mollicutes*. Aunque, por su complejidad, requerimientos de reactivos y equipos, como de personal altamente especializado, no constituyen una herramienta utilizada en el diagnóstico microbiológico rutinario de las infecciones causadas por micoplasmas (Razin, 1985).

### **2.10 Susceptibilidad antimicrobiana**

Los micoplasmas por ser microorganismos sin pared celular, son insensibles a los agentes antimicrobianos que afectan la síntesis o ensamblaje del peptidoglicano como son los  $\beta$ -lactámicos y la vancomicina. No son susceptibles a las sulfamidas ni al trimetropin-sulfametoxazol, ya que no sintetizan ácido fólico. Sin embargo, son sensibles a ciertos antibióticos que afectan la síntesis de proteínas (Waites et al., 2005).

*Ureaplasma* spp. es resistente a las lincosamidas, excepto a las altas concentraciones de las mismas, y aun cuando se han reportado algunos aislamientos resistentes a altas concentraciones de eritromicina in vitro, es sensible a la acción de los macrólidos, como la eritromicina, y la aparición de mutantes resistentes es un hecho infrecuente (Palu et al., 1989). En contraste con esto, *M. hominis* es de por sí resistente a la eritromicina, azitromicina y claritromicina en condiciones in vitro, pero sensible a otros macrólidos como la josamicina, la miocamicina y también al grupo de las lincomicinas (Furneri et al., 2000; Waites et al., 2005).

El mecanismo de resistencia a las tetraciclinas de los micoplasmas está basado en la adquisición del determinante *tetM*. La frecuencia de aparición de resistencia ante este antibiótico puede estar mediado por varios factores como la localización geográfica, prescripción antibiótica innecesaria y promiscuidad sexual (Cassell et al., 2001; Haggerty et al., 2008).

La sensibilidad antimicrobiana es determinada en relación a puntos de corte de las concentraciones mínimas inhibitorias para los distintos antimicrobianos que han mostrado determinada actividad in vitro o en el tratamiento empírico de infecciones causadas por micoplasmas (Hilliard et al., 2005). Los valores de resistencia antimicrobiana de los micoplasmas han aumentado considerablemente en los últimos años y antibióticos de elección como las quinolonas, aminoglúsidos y tetraciclinas, han comenzado a disminuir su efectividad. Por tanto, el hecho de contar con métodos de evaluación de la sensibilidad antimicrobiana a diferentes antibióticos fáciles de incorporar al diagnóstico rutinario ofrece ventajas a la hora de determinar el tratamiento adecuado a las infecciones asociadas a estos microorganismos. (Waites et al., 2001; Hilliard et al., 2005)

### **2.11 Tratamiento antimicrobiano para las infecciones por micoplasmas**

El tratamiento de las infecciones por micoplasmas resulta limitado en comparación con el de otros microorganismos. Esta limitación viene dada principalmente por la necesidad de realizar ensayos de susceptibilidad antimicrobiana (Waites et al., 2005). Algunos antimicrobianos han mostrado una gran efectividad para la erradicación de estas

infecciones, pero el tratamiento sigue siendo empírico (Ríos et al., 2005; Waites y Taylor - Robinson, 2007).

En los últimos años se han reportado un gran número de casos de fallos en la utilización de determinados antibióticos para la erradicación de infecciones por micoplasmas. Antimicrobianos como azitromicina, eritromicina, cefixitina y doxiciclina, se encuentran dentro de este grupo (Baier et al., 2003; Bradshaw et al., 2006; Haggerty et al., 2008).

### **2.12 Epidemiología de las infecciones causadas por micoplasmas**

La epidemiología de las infecciones por micoplasmas no está completamente dilucidada. La adquisición de especies de micoplasmas puede estar asociada principalmente con la transmisión primaria, que está involucrada con el contacto directo o transferido mediante aerosoles o fómites, alimentos, agua, insectos vectores y también adquisición nosocomial. (Waites, 2000; Waites et al., 2001; Brooks et al., 2007).

En adultos inmunocompetentes, la infección por micoplasmas es localizada y no resulta en enfermedades severas, atendiendo a la baja virulencia y carácter oportunista de estos microorganismos. En los pacientes inmunocomprometidos, las infecciones extra genitales son comunes, pudiendo llegar a ser graves (Waites, 2000; Pérez y Almanza, 2001; Anagrius et al., 2008).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

## III. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Tipo de estudio

Las investigaciones se realizaron a través de cuatro estudios de análisis de corte transversal, a partir de la implementación del método de la PCR y sus variantes desarrolladas en el Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de Micoplasmas (LNRIM), para detección e identificación de especies de micoplasmas y ureaplasmas de interés clínico en salud pública.

### 3.2 Marco de la investigación

Este trabajo fue desarrollado LNRIM, perteneciente al Departamento de Bacteriología-Micología de la Vice Dirección de Microbiología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK) en La Habana, Cuba, entre los años 1996 al 2008.

### 3.3 Procedimientos generales por objetivos

**3.3.1 Objetivo 1. Desarrollar un método de PCR-Simple y uno de PCR-Anidada para el diagnóstico de *M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. fermentans* y *U. urealyticum* en muestras clínicas de pacientes con síntomas respiratorios**

En el LNRIM del IPK (LNRIM-IPK) entre los años 1996 y 1998 se desarrolló una combinación entre dos variantes de la PCR, la primera fue una PCR-Simple para la detección de muestras positivas a la clase *Mollicutes* y la segunda fue una PCR-Anidada para la identificación de *M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. fermentans* y *U. urealyticum*; una vez validadas estas variantes en cepas de referencia, fueron aplicadas en el estudio de muestras clínicas de pacientes con síntomas respiratorios.

### **3.3.1.1 Validación del método de la PCR-Simple y PCR-Anidada en cepas de referencia**

#### **3.3.1.1.1 Procedimientos para la obtención del ADN de cepas de referencia**

**Cepas de referencia:** En el estudio fueron utilizadas cepas de referencia de la “Colección de Cultivos Tipo Americana” (ATCC, siglas en inglés) de *M. hominis* (ATCC 23114), *M. pneumoniae* (ATCC 22451), *M. fermentans* (ATCC 19989) y *U. urealyticum* (ATCC 27618), pertenecientes a la colección de cepas del LNRIM-IPK.

**Cultivos primarios de cepas de referencia:** De cada cepa referencia se tomaron 0,2 mL y se inocularon en un tubo con 2,5 mL de medio de cultivo F líquido selectivo para micoplasmas descrito por Bolske et al., 1988; Seguidamente los tubos inoculados se incubaron a 37°C y se realizaron lecturas diarias hasta los siete días para detectar cambios de coloración. Los cultivos que mostraron cambio de color de rosado claro a rosado fuerte se denominaron “cultivos primarios positivos”, mientras los que no cambiaron de color se consideraron “cultivos primarios negativos” y fueron eliminados.

**Obtención del ADN de referencia:** De cada cultivo primario positivo se tomó 1 mL y se transfirió a un vial estéril, se centrifugó a 12 000 rpm por 10 min, el sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en 0,1 mL de Tampón Fosfato Salino (TFS) estéril, se homogenizó en vórtex durante 2 minutos y se repitió la centrifugación; nuevamente el sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en 0,1 mL de agua bidestilada estéril y se homogenizó en vórtex durante 1 minuto, seguidamente se colocó la suspensión en bloque térmico (Labnet, E.U.A.) a 100°C durante 10 minutos e inmediatamente se colocó en un recipiente con hielo. Cada vial fue conservado a -20°C hasta su uso.

### 3.3.1.1.2 Procedimientos para la amplificación del ADN de cepas de referencia

#### 3.3.1.1.2.1 Método de la PCR-Simple para la detección de la clase *Mollicutes*

**Juego de cebadores:** Para el método de la PCR-Simple se seleccionaron los cebadores Moll-1 y Moll-2, complementarios a un fragmento del gen del ARNr 16S de la clase *Mollicutes*, reportados por Deng et al., 1992. Obsérvese la tabla 2.

Tabla 2. Información de los cebadores específicos para la clase *Mollicutes*.

Especificidad	Cebadores	Secuencia de nucleótidos (5' - 3')	Tm (°C)	Talla del fragmento (pb)
Clase <i>Mollicutes</i>	Moll-1	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AGG A	56	1500
	Moll-2	CGT AGG GAT ACC TTG TTA CGA CT	68	

Tm: temperatura *melting*

pb: pares de base

**Programa de amplificación:** Conociendo el tamaño del fragmento a amplificar y las temperaturas *melting* ( $T_m$ ) de cada cebador, se diseñó un programa de amplificación para una PCR-Simple específica a la clase *Mollicutes*, ver tabla 3.

Tabla 3: Programa para la PCR-Simple de clase *Mollicutes*.

Etapas	Temperaturas y tiempos	Ciclos
Desnaturalización	95°C por 4 min	1
Desnaturalización Hibridación Extensión	94°C por 1 min 55°C por 1 min 72°C por 2 min	40
Extensión final	72°C por 10 min	1

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador “Mastercycler personal” (Eppendorf, Alemania).

**Mezcla de reacción:** La mezcla de reacción en un volumen final de 50  $\mu$ L contenía 0,5  $\mu$ M de cada cebador, 1X del Tampón II (Perkin Elmer, E.U.A.), 1,5 mM de  $MgCl_2$  (Perkin Elmer, E.U.A.), 200  $\mu$ M de cada desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) (Promega, E.U.A.), 1,25 U de *Taq* ADN polimerasa (Perkin Elmer, E.U.A.) y 5  $\mu$ L de muestra de ADN de cepa de referencia.

**Análisis de los productos de ADN amplificados:** Los productos de ADN amplificados por la PCR fueron analizados mediante electroforesis submarina en geles de agarosa al 1%, según metodología descrita por Sambrook et al., 1989.

**3.3.1.1.2.2 Método de la PCR-Anidada para la identificación de *M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. fermentans* y *U. urealyticum***

**Juegos de cebadores:** Para el método de la PCR-Anidada fueron seleccionados cuatro juegos de cebadores complementarios (tabla 4), cada uno a regiones variables del gen del ARNr 16S, el Mpn1-Mpn2 para *M. pneumoniae*, el Mh1-Mh2 para *M. hominis*, el Mf1-Mf2 para *M. fermentans* y Uu1-Uu2 para *U. urealyticum*, todos reportados por van Kuppeveld et al., 1992.

Tabla 4. Información de los cebadores específicos para especies de micoplasmas.

Especificidad	Cebadores	Secuencia de nucleótidos (5' - 3')	Tm (°C)	Talla del fragmento (pb)
<i>M. pneumoniae</i>	Mpn1	AAG GAC CTG CAA GGG TTC GT	62	277
	Mpn2	CTC TAG CCA TTA CCT GCT AA	58	
<i>M. hominis</i>	Mh1	TGA AAG GCG CTG TAA GGC GC	62	281
	Mh2	GTC TGC AAT CAT TTC CTA TTG CAA A	68	
<i>M. fermentans</i>	Mf1	GAA GCC TTT CTT CGC TGG AG	62	272
	Mf2	ACA AAA TCA TTT CCT ATT CTG TC	60	
<i>U. urealyticum</i>	Uu1	CAT TAA ATG TCG GCT CGA ACG AG	60	315
	Uu2	GCA GTA TCG CTA GAA AAG CAA C	64	

Tm: temperatura *melting*  
pb: pares de base

**Programa de amplificación:** Conociendo el tamaño de los fragmentos a amplificar y las Tm de cada cebador, se diseñó el siguiente programa (tabla 5), para amplificar por una PCR-Anidada las cuatro especies en estudio.

Tabla 5. Programa para la PCR-Anidada para *M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. fermentans* y *U. urealyticum*.

Etapas	Temperaturas y tiempos	Ciclos
Desnaturalización	95°C por 4 min	1
Desnaturalización Hibridación Extensión	94°C por 30 seg 55°C por 30 seg 72°C por 1 min	30
Extensión final	72°C por 8 min	1

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador “Mastercycler personal” (Eppendorf, Alemania).

**Mezcla de reacción:** Se prepararon cuatro mezclas de reacción con un volumen final de 50  $\mu$ L, cada mezcla contenía uno de los juegos de cebadores seleccionados en concentración de 0,5  $\mu$ M, además de 1X del Tampón II (Perkin Elmer, E.U.A.), 1,5 mM de  $MgCl_2$  (Perkin Elmer, E.U.A.), 200  $\mu$ M de cada dNTP (Promega, E.U.A.), 1,25 U de *Taq* ADN polimerasa (Perkin Elmer, E.U.A.) y 5  $\mu$ L del producto del ADN amplificado por la PCR-Simple Clase *Mollicutes*.

**Análisis de los productos del ADN amplificados:** Los productos de ADN amplificados fueron analizados en geles de agarosa al 2%, mediante electroforesis submarina siguiendo la metodología descrita por Sambrook et al., 1989.

### **3.3.1.2 Aplicación del método de la PCR-Simple y la PCR-Anidada para determinar la frecuencia de *M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. fermentans* y *U. urealyticum* en muestras clínicas de pacientes con síntomas respiratorios**

#### **Diseño y universo de trabajo**

Se realizó un estudio analítico de corte transversal conformado a partir muestras clínicas de 172 pacientes; de ellos 82 eran positivos al VIH y 90 negativos al VIH. Todos los pacientes con sintomatología respiratoria aguda y con sospecha de infección por micoplasmas incluidos en el estudio fueron atendidos en el Hospital del IPK, en el período comprendido de enero a septiembre de 1997.

#### **3.3.1.2.1 Procedimiento para la obtención del ADN de muestras clínicas**

**Muestras clínicas:** Se analizaron 172 muestras de esputo, correspondiendo una muestra por cada paciente. Cada muestra fue recolectada en horas de la mañana y se trasladaron en contenedor de bioseguridad a temperatura ambiente al LNRIM-IPK.

**Cultivos primarios de muestras clínicas:** Cada muestra de esputo se resuspendió 2 mL de TFS, se homogenizó vigorosamente y se tomaron 0,2 mL para inocularlos en un tubo con 2,5 mL de medio de cultivo F líquido siguiendo la metodología descrita para la obtención de los cultivos primarios de cepas de referencia.

**Obtención de ADN:** Se obtuvieron muestras de ADN de cada cultivo primario positivo de las muestras clínicas, para lo cual se siguió la metodología descrita con las cepas de referencia.

#### **3.3.1.2.2 Métodos y procedimientos para la amplificación del ADN de muestras clínicas**

**Método de la PCR-Simple y PCR-Anidada para el análisis de las muestras clínicas:** Todas las muestras de ADN se analizaron por la PCR-Simple para la detección de la clase *Mollicutes* descrita en el acápite 3.3.1.1.1 y las que fueron positivas a mollicutes se les realizó la PCR-Anidada descrita en el acápite 3.3.1.1.2 para identificar las especies de *M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. fermentans* y *U. urealyticum*.

**3.3.2 Objetivo 2. Desarrollar un método de PCR-Múltiple para el diagnóstico de *U. parvum* y *U. urealyticum* e identificar la frecuencia de estas especies y de *M. hominis* en el tracto genital de mujeres infértiles y fértiles.**

En el LNRIM-IPK, entre los años 2001 y 2003 se desarrolló una PCR-Múltiple para identificar *U. parvum* y *U. urealyticum*. Una vez validada la PCR-Múltiple en cepas de referencia, se estimó la frecuencia de *M. hominis*, *U. parvum* y *U. urealyticum* en muestras clínicas de mujeres infértiles y fértiles, donde se combinaron las metodologías del estuche de diagnóstico comercial *Mycofast Evolution-2* (MFE-2) de la *International Microbiol*, Francia y el PCR-Múltiple desarrollado en este acápite.

**3.3.2.1 Validación del método de la PCR-Múltiple para identificar *U. parvum* y *U. urealyticum***

**3.3.2.1.1 Procedimiento para la obtención del ADN de cepas de referencia**

**Cepas de referencia:** En el estudio fueron utilizadas cepas de referencia de *U. parvum* (ATCC 2815) y *U. urealyticum* (ATCC 27618) y *M. hominis* (ATCC 23114), todas de la colección de cepas del LNRIM-IPK.

**Cultivos primarios de cepas de referencia:** Las cepas de referencia se analizaron por el estuche de diagnóstico comercial MFE-2 siguiendo la metodología del fabricante. Brevemente, cada cepa se inoculó en un frasco con el medio de transporte U.M.M.transp.<sup>®</sup> y el contenido del frasco se vertió en otro frasco con el medio U.M.M.lyo.<sup>®</sup>, se homogenizó y se transfirió 0,1 mL en cada pocillo de la galería, como se describe en el Anexo de este

documento. El frasco con un remanente de 1 mL del medio U.M.M.lyo.<sup>®</sup> con la cepa de referencia se incubó a 37°C por tres días, nombrándole “cultivo primario”; si el cultivo cambia de color de amarillo a rosado, se clasificó como positivo, sino como negativo y se eliminó.

**Obtención del ADN de cepas de referencia:** A todos los cultivos primarios positivos se les realizó la extracción del ADN por el método de choque osmótico y térmico descrito en el 3.3.1.1.1.

### 3.3.2.1.2 Procedimientos para la amplificación del ADN de cepas de referencia

**Juegos de cebadores:** Para el método de la PCR-Múltiple fue necesario seleccionar dos juegos de cebadores de regiones dianas diferentes. En la tabla 6 se muestran los juegos de cebadores seleccionados, el UPS-UPSA complementarios a un fragmento del gen del ARNr 16S de *U. parvum* y el UUS2-UUA2 complementarios a un fragmento del gen de la ureasa de *U. urealyticum*, reportados por Kong et al., 2000.

Tabla 6. Información de los cebadores específicos para especies de ureaplasmas.

Especificidad	Cebadores	Secuencia de nucleótidos (5' - 3')	Tm (°C)	Talla del fragmento (pb)
<i>U. parvum</i>	UPS	CAT CAT TAA ATG TCG GCC CGA ATG G	72	812
	UPSA	TAG AAT CCG ACC ATA TGA ATT TTT A	64	
<i>U. urealyticum</i>	UUS2	CAG GAT CAT CAA ATC AAT TCA C	60	418
	UUA2	CAT AAT GTT CCC CTT CGT CTA	60	

Tm: temperatura *melting*

pb: pares de base

**3.3.2.1.2.1 Métodos de la PCR-Simple de *U. parvum* y PCR-Simple de *U. urealyticum*.**

Previamente al método de la PCR-Múltiple se realizó un estudio de especificidad mediante una PCR-Simple para cada especie, donde se utilizaron muestras de ADN de referencia de *U. parvum*, *U. urealyticum* y *M. hominis*.

**Programa de amplificación para la PCR-Simple de *U. parvum* y PCR-Simple de *U. urealyticum*:** Conociendo el tamaño de los fragmentos a amplificar y las T<sub>m</sub> de cada cebador, se diseñaron programas de amplificación (tabla 7), para evaluar la especificidad de cada PCR.

Tabla 7. Programas para la PCR-Simple de *U. parvum* y PCR de *U. urealyticum*.

Etapas	PCR-Simple <i>U. parvum</i>		PCR-Simple <i>U. urealyticum</i>	
	Temperaturas y tiempos	Ciclos	Temperaturas y tiempos	Ciclos
Desnaturalización	95°C por 4 min	1	95°C por 4 min	1
Desnaturalización Hibridación Extensión	94°C por 30 seg 55°C por 30 seg 72°C por 1 min	35	94°C por 30 seg 57°C por 30 seg 72°C por 1 min	35
Extensión final	72°C por 8 min	1	72°C por 8 min	1

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador “Mastercycler personal” (Eppendorf, Alemania).

**Mezclas de reacción de las PCR-Simple:** Para ambos PCR se prepararon dos mezclas de reacción con volúmenes finales de 50 µL, a una mezcla se le adicionó el juego de cebadores UPS-UPSA y a la otra el juego de cebadores UUS2-UUA2, ambos a concentraciones de 0,5 µM, además 1X de Tampón II (Perkin Elmer, E.U.A.), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Perkin Elmer, E.U.A.), 200 µM de cada dNTP (Promega, E.U.A.), 1,25 U de *Taq* ADN polimerasa (Perkin Elmer, E.U.A.) y 5 µL de muestra de ADN de cepa de referencia.

**Análisis de los productos del ADN amplificados por las PCR-Simple:** Los productos del ADN amplificado fueron analizados mediante electroforesis submarina en geles de agarosa al 2% y se siguió la metodología descrita por Sambrook et al., 2000.

**3.3.2.1.2.2 Método de la PCR-Múltiple para *U. parvum* y *U. urealyticum***

**Programas de amplificación de la PCR-Múltiple para *U. parvum* y *U. urealyticum*:** A partir de los resultados de las PCR-Simple para cada especie de ureaplasmas, se realizó una PCR-Múltiple con dos programas de amplificación (tabla 8), donde solo se variaron las temperaturas de hibridación.

Tabla 8. Programas para la PCR-Múltiple de *U. parvum* y *U. urealyticum*.

Etapas	Programa #1		Programa #2	
	Temperaturas y tiempo	Ciclos	Temperaturas y tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95°C por 4 min	1	95°C por 4 min	1
Desnaturalización Hibridación Extensión	94°C por 30 seg 55°C por 30 seg 72°C por 1 min	35	94°C por 30 seg 57°C por 30 seg 72°C por 1 min	35
Extensión final	72°C por 5 min	1	72°C por 5 min	1

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador “Mastercycler personal” (Eppendorf, Alemania).

**Mezcla de reacción de la PCR-Múltiple para *U. parvum* y *U. urealyticum*:** En una sola mezcla de reacción, con un volumen final de 50 µL, se adicionaron los dos juegos de cebadores a concentraciones de 0,5 µM, además 1X de Tampón II (Perkin Elmer, E.U.A.), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Perkin Elmer, E.U.A.), 200 µM de cada dNTP (Promega, E.U.A.), 1,25

U de *Taq* ADN polimerasa (Perkin Elmer, E.U.A.) y 5 µL de muestra de ADN de cepa de referencia.

**Análisis de los productos del ADN amplificado por la PCR-Múltiple para *U. parvum* y *U. urealyticum*:** Los productos del ADN amplificado fueron analizados mediante electroforesis submarina en geles de agarosa al 2% y se siguió la metodología descrita por Sambrook et al., 2000.

### **3.3.2.2 Identificación de la frecuencia de *M. hominis*, *U. parvum* y *U. urealyticum* en muestras clínicas de mujeres infértiles y fértiles**

#### **Diseño y universo de trabajo**

Se realizó un estudio analítico de corte transversal a partir de muestras clínicas de 300 mujeres, de ellas 150 eran mujeres infértiles y 150 mujeres fértiles, todas atendidas en consultas externas del Hospital Docente Ginecobstétrico “Ramón González Coro” (HDGRGC), en Ciudad de La Habana, en el período de enero a mayo del año 2002.

#### **3.3.2.2.1 Procedimientos y métodos para la identificación de *U. parvum*, *U. urealyticum* y *M. hominis* en muestras clínicas**

**Muestras clínicas:** De cada paciente se obtuvo una muestra de exudado endocervical, para un total de 300 muestra clínicas.

**Diagnóstico de *M. hominis* y *Ureaplasma* spp.:** A partir de las muestras de exudado endocervical se realizó la identificación de *M. hominis* y *Ureaplasma* spp. mediante el estuche comercial MFE-2, siguiendo el flujograma del fabricante descrito en el Anexo de este documento.

**Cultivos primarios de muestras clínicas:** Al finalizar el flujograma del MFE-2, el frasco con un remanente de 1 mL del medio U.M.M.lyo.<sup>®</sup> y muestra clínica, se incubó a 37°C, y se le nombró “cultivo primario”; si la muestra de este cultivo resultaba positiva a *Ureaplasma* spp. por el MFE-2, este cultivo se colocaba a 4°C y antes de los siete días se trasladaba en un contenedor de bioseguridad al LNRIM-IPK. Los cultivos primarios de las muestras negativas a *Ureaplasma* spp. por el MFE-2 fueron eliminados.

**Obtención de ADN:** A todos los cultivos primarios positivos a *Ureaplasma* spp. por el MFE-2 se les realizó la extracción del ADN por el método de choque osmótico y térmico descrito en el 3.3.1.1.1.

**PCR-Múltiple para *U. parvum* y *U. urealyticum*:** De las muestras de ADN obtenidas de los cultivos primarios positivos a *Ureaplasma* spp. por el MFE-2, se realizó la identificación de *U. parvum* y *U. urealyticum* mediante la PCR-Múltiple descrita en el acápite 3.3.2.2.1.

**3.3.3 Objetivo 3. Seleccionar un método de PCR-Simple para el diagnóstico de *M. genitalium***

En el LNRIM-IPK entre los años 2006 y 2007 se desarrolló un método de PCR-Simple para el diagnóstico de *M. genitalium*, para lo que fue necesario estudiar dos juegos de cebadores para validar el método de la PCR-Simple en cepas de referencia y su posteriormente aplicación en el estudio de muestras clínicas.

### **3.3.3.1 Validación del método de la PCR-Simple para *M. genitalium* en cepas de referencia**

#### **3.3.3.1.1 Muestras de ADN de referencia**

**ADN de cepas de referencia:** En el estudio se utilizaron muestras de ADN de cepas referencia conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , correspondientes a *M. genitalium* (R326), *M. hominis* (ATCC 23114), *U. parvum* (ATCC 2815) y *U. urealyticum* (ATCC 27618) de la colección de cepas del LNRIM-IPK.

#### **3.3.3.1.2 Procedimientos para la amplificación del ADN de cepas de referencia**

##### **Método de la PCR-Simple para la identificación de *M. genitalium***

**Juegos de cebadores para la PCR-Simple de *M. genitalium*:** Fueron seleccionados los juegos de cebadores MgF-MgR complementarios a una región del gen del ARNr 16S y el MgPaF-MgPaR complementarios a una región del gen de la proteína de adhesión (*mgpa*), ambos específicos para *M. genitalium* y descritos por Jensen et al., 2003 y Jensen et al., 2004. Obsérvese tabla 9.

Tabla 9. Información de los cebadores específicos para *M. genitalium*.

Especificidad	Cebadores	Secuencia de nucleótidos (5' - 3')	Tm (°C)	Talla del fragmento (pb)
<i>M. genitalium</i> (Gen ARNr 16S)	MgF	TAC ATG CAA GTC GAT CGG AAG TAG C	68	427
	MgR	AAA CTC CAG CCA TTG CCT GCT AG	62	
<i>M. genitalium</i> (Gen <i>mgpa</i> )	MgPaF	GAG AAA TAC CTT GAT GGT CAG CAA	63	78
	MgPaR	GTT AAT ATC ATA TAA AGC TCT ACC GTT GTT ATC	60	

Tm: temperatura *melting*

pb: pares de base

**Programas de amplificación de la PCR-Simple para *M. genitalium*:** Conociendo el tamaño de los fragmentos a amplificar y las Tm de cada cebador, se diseñó un programa de amplificación (tabla 10).

Tabla 10. Programa para la PCR-Simple de *M. genitalium*.

Etapas	Temperaturas y tiempos	Ciclos
Desnaturalización	95°C por 4 min	1
Desnaturalización Hibridación Extensión	94°C por 30 seg 55°C por 30 seg 72°C por 1 min	35
Extensión final	72°C por 5 min	1

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador “Mastercycler personal” (Eppendorf, Alemania).

**Mezcla de reacción de la PCR-Simple para *M. genitalium*:** Se prepararon dos mezclas de reacción, con un volumen final de 50 µL, a cada una se le adicionó uno de los juegos de cebadores seleccionados a concentraciones de 0,5 µM, además de 1X del Tampón II (Perkin Elmer, E.U.A.), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Perkin Elmer, E.U.A.), 200 µM de cada dNTP (Promega, E.U.A.), 1,25 U de *Taq* ADN polimerasa (Perkin Elmer, E.U.A.) y 5 µL de muestra de ADN de cepa de referencia.

**Análisis de los productos del ADN amplificado por la PCR-Simple para *M. genitalium*:** Los productos del ADN amplificado fueron analizados mediante electroforesis submarina en geles de agarosa al 4%, según metodología descrita por Sambrook et al., 2000.

**Ensayo de especificidad de la PCR-Simple para *M. genitalium*:** A partir de 5 µL del ADN de las cepas de referencia de *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. parvum* y *U. urealyticum* se realizaron ensayos de especificidad de la PCR-Simple con los dos juegos de cebadores seleccionados y el programa diseñado para esta PCR-Simple.

**Ensayo de sensibilidad de la PCR-Simple para *M. genitalium*:** A partir del ADN de la cepa de referencia de *M. genitalium* se realizaron diluciones de 1:10 desde una concentración de 12 500 pg/µL hasta 0,00125 pg/µL. De cada dilución se tomaron 5 µL para realizar los ensayos de la PCR con los dos juegos de cebadores seleccionados y el programa diseñado para esta PCR-Simple.

### **3.3.3.2 Identificación de *M. genitalium* por la PCR-Simple en muestras clínicas de pacientes con uretritis no gonocócica**

#### **Diseño y universo de trabajo**

Se realizó un estudio analítico de corte transversal a partir de muestras clínicas de 34 pacientes masculinos con diagnóstico clínico de uretritis no gonocócica (UNG) que acudieron al laboratorio de microbiología del Hospital Militar "Carlos Juan Finlay" (HMCJF), en el período comprendido entre octubre - diciembre del 2006.

### 3.3.3.2.1 Procedimientos y métodos

**Muestras clínicas:** En el laboratorio del HMCJF se recolectaron una muestra clínica de cada paciente, para un total de 34 muestras de exudados uretrales. Las tomas de las muestras se realizaron siguiendo la metodología descrita por Vandepitte et al., 2003; una vez tomada la muestra, inmediatamente el hisopo se sumergió en un tubo con 2,5 mL de medio de cultivo UN descrito por Bolske et al., 1988, el hisopo se agitó vigorosamente dentro del medio de cultivo y se retiró del tubo presionando contra las paredes para descargar la mayor cantidad de medio posible.

**Cultivos primarios de las muestras clínicas:** Los tubos de cultivo con la muestra clínica se incubaron a 37°C nombrándoles cultivos primarios y antes de los siete días fueron trasladados al LNRIM-IPK en contenedores de bioseguridad.

**Obtención de ADN:** En el LNRIM-IPK a todos los cultivos primarios obtenidos de muestras clínicas se les realizó el método de choque osmótico y térmico para la obtención del ADN, según se describe en el acápite 3.3.1.1.1.

**Detección de muestras positivas a la clase *Mollicutes*:** Las muestras de ADN obtenidas de los cultivos primarios de exudados uretrales se analizaron por la PCR-Simple de clase *Mollicutes* descrita en el objetivo 1.

**Identificación de *M. genitalium*:** Las muestras de ADN positivas a la clase *Mollicutes* fueron estudiadas por las dos PCR-Simple desarrolladas en este acápite.

**3.3.4 Objetivo 4. Estimar la frecuencia de *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. parvum* y *U. urealyticum* en pacientes con síntomas urogenitales a partir del desarrollo de un método de PCR-Múltiple específico para estas especies de micoplasmas y ureaplasmas**

En el LNRIM-IPK, entre los años 2007 y 2008, se desarrolló un método de PCR-Múltiple para identificar las especies de *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. parvum* y *U. urealyticum*, el que fue validado con cepas de referencia y después aplicado en estudios de muestras clínicas de pacientes con síntoma urogenitales.

**3.3.4.1 Validación del método de la PCR-Múltiple para identificar *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. parvum* y *U. urealyticum* en cepas de referencia**

**3.3.4.1 Muestras de ADN de referencia**

**ADN de cepas de referencia:** En el estudio se utilizaron muestras de ADN de cepas referencia conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , correspondientes a *M. genitalium* (R326), *M. hominis* (ATCC 23114), *U. parvum* (ATCC 2815) y *U. urealyticum* (ATCC 27618) de la colección de cepas del LNRIM-IPK.

**3.3.4.2 Procedimientos para la amplificación del ADN de cepas de referencia**

**PCR-Múltiple para la identificación de *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. parvum* y *U. urealyticum***

**Juegos de cebadores para la PCR-Múltiple:** Fueron seleccionados cuatro juegos de cebadores especies-específicos (tabla 11), el Mh1-Mh2 para *M. hominis* (descrito en el

acápites 3.3.1.2.2), UPS-UPSA para *U. parvum*, UUS2-UUA2 para *U. urealyticum* (descritos ambos en el acápites 3.3.2.2.1) y el MgPaF-MgPaR para *M. genitalium* (descrito en el acápites 3.3.3.2.1).

Tabla 11. Información de los cebadores específicos para especies de micoplasmas.

Especificidad	Cebadores	Secuencia de nucleótidos (5' - 3')	Tm (°C)	Talla del fragmento (pb)
<i>M. hominis</i>	Mh1	TGA AAG GCG CTG TAA GGC GC	62	280
	Mh2	GTC TGC AAT CAT TTC CTA TTG CAA A	68	
<i>M. genitalium</i>	MgPaF	GAG AAA TAC CTT GAT GGT CAG CAA	65	78
	MgPaR	GTT AAT ATC ATA TAA AGC TCT ACC GTT GTT ATC	62	
<i>U. parvum</i>	UPS	CAT CAT TAA ATG TCG GCC CGA ATG G	72	812
	UPSA	TAG AAT CCG ACC ATA TGA ATT TTT A	64	
<i>U. urealyticum</i>	UUS2	CAG GAT CAT CAA ATC AAT TCA C	60	418
	UUA2	CAT AAT GTT CCC CTT CGT CTA	60	

Tm: temperatura *melting*

pb: pares de base

**Programa de amplificación:** Conociendo el tamaño de los fragmentos a amplificar y las Tm de cada cebador, se diseñaron tres programas (tabla 12), para la PCR-Múltiple especie-específica.

Tabla 12. Programas para la PCR-Múltiple de *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. parvum* y *U. urealyticum*

Etapas	Programa #1		Programa #2		Programa #3	
	Temperaturas y tiempo	Ciclos	Temperaturas y tiempo	Ciclos	Temperaturas y tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95°C por 4 min	1	95°C por 4 min	1	95°C por 4 min	1
Desnaturalización	94°C por 30 seg	35	94°C por 30 seg	35	94°C por 30 seg	35
Hibridación	55°C por 30 seg		57°C por 30 seg		60°C por 30 seg	
Extensión	72°C por 1 min		72°C por 1 min		72°C por 1 min	
Extensión final	72°C por 5 min	1	72°C por 5 min	1	72°C por 5 min	1

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador “Mastercycler personal” (Eppendorf, Alemania).

**Mezcla de reacción para la PCR-Múltiple:** Se preparó una sola mezcla de reacción con un volumen final de 50  $\mu$ L, conteniendo los cuatro juegos de cebadores a concentraciones de 0,5  $\mu$ M cada uno, además de 1X del Tampón II (Perkin Elmer, E.U.A.), 1,5 mM de  $MgCl_2$  (Perkin Elmer, E.U.A.), 200  $\mu$ M de cada dNTP (Promega, E.U.A.), 1,25 U de *Taq* ADN polimerasa (Perkin Elmer, E.U.A.) y 5  $\mu$ L de muestra de ADN de cepa de referencia.

**Análisis de los productos del ADN amplificado:** Los productos del ADN amplificado, fueron analizados mediante electroforesis submarina en geles de agarosa al 4%, según la metodología descrita por Sambrook et al., 2000.

#### **3.3.4.2 Aplicación de la PCR-Múltiple de *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. parvum* y *U. urealyticum* para estimar la frecuencia de estas especies en muestras clínicas de pacientes con síntomas urogenitales**

##### **Diseño y universo de trabajo**

Se realizó un estudio analítico de corte transversal a partir de muestras clínicas de 84 pacientes con síntomas urogenitales. En universo quedó conformado por un grupo de 50 mujeres con diagnóstico clínico de inflamación pélvica y con secreción endocervical, que acudieron al laboratorio del Hospital del IPK en el período de entre abril y mayo del 2008, y otro grupo de 34 hombres con uretritis no gonocócica, citados en el acápite 3.3.3 del objetivo 3.

#### 3.3.4.2.1 Procedimientos y métodos

**Muestras clínicas:** En el laboratorio del Hospital del IPK, de cada mujer se tomó una muestra de exudados endocervical, según metodología descritas por Vandepitte et al., 2003; una vez tomada la muestra, inmediatamente el hisopo se sumergió en un tubo con 2,5 mL de medio de cultivo UN descrito por Bolske et al., 1988, el hisopo se agitó vigorosamente dentro del medio de cultivo y se retiró del tubo presionando contra las paredes para descargar la mayor cantidad de medio posible, posteriormente el tubo fue trasladado hacia el LNRIM-IPK en un contenedor de bioseguridad. Las muestras de ADN correspondientes a los pacientes masculinos están citadas en el acápite 3.3.3.2.

**Cultivo primario de muestras clínicas:** En el LNRIM-IPK se recibieron 50 tubos con el medio de cultivo más la muestra de exudado endocervical, estos tubos se incubaron a 37°C hasta siete días, nombrándoles cultivos primarios.

**Obtención de ADN:** La extracción del ADN, procedente de los cultivos primarios de los exudados endocervical, se realizó por el método de choque osmótico y térmico descrito en el acápite 3.3.1.1. Las muestras de ADN de los pacientes masculinos fueron las mismas que se usaron en el acápite 3.3.3.2, las que se mantuvieron conservadas a -20°C en el LNRIM-IPK.

**Detección de las muestras positivas a la clase *Mollicutes*:** Las muestras de ADN obtenidas de los cultivos primarios de los exudados endocervical y uretral, se analizaron por la PCR-Simple para la clase *Mollicutes* descrita en el objetivo 1.

**Identificación de *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. parvum* y *U. urealyticum*:** Las muestras de ADN que fueron positivas mollicutes fueron estudiadas por la PCR-Múltiple descrita en este acápite para la identificación de *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. parvum* y *U. urealyticum*.

### **3.4 Procesamiento y análisis estadístico de la información**

Se confeccionó una base de datos por el programa Excel de Microsoft Office para el almacenamiento de la información. Los datos se procesaron en SPSS versión 13,5.

En dependencia de los objetivos trazados, se calcularon frecuencias absolutas, relativas y el valor de  $p$ , considerando asociación cuando este fue inferior a 0,05.

Se utilizó la razón de prevalencia (RP) como medida estadística para evaluar la frecuencia de infecciones por micoplasmas o ureaplasmas en pacientes con riesgos (positivos al VIH y mujeres infértiles) comparándolos con población general que acuden o se hospitalizan en servicios de salud.

Los resultados se presentan en forma de tablas y gráficos.

### **3.5 Aspectos éticos**

Los protocolos de las investigaciones desarrolladas correspondieron a Proyectos Ramales aprobados por el Ministerio de Salud Pública, la Comisión Científica Especializada de Microbiología y el Comité de Ética de la Investigación del IPK.

Las buenas prácticas de laboratorio se cumplieron estrictamente, junto con las medidas de bioseguridad establecidas para el trabajo y manipulación de microorganismos según los niveles de riesgo establecidos por la Comisión Nacional de Seguridad Biológica en la Resolución 38/2006 (CITMA, 2006).

Las muestras clínicas recibidas en el LNRIM-IPK fueron tomadas de pacientes que acudieron a las áreas de toma de muestras del HDGRGC, HMCJF y del IPK. No se reveló la identidad de los pacientes. La información fue conservada con carácter confidencial. Los resultados obtenidos del diagnóstico por el laboratorio se enviaron por escrito exclusivamente a los médicos de asistencia que habían indicado las pruebas, también estos resultados fueron utilizados por los investigadores con fines científicos.

La información relacionada con las investigaciones desarrolladas se mantuvo conservada y protegida en los archivos del LNRIM-IPK.

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Desarrollo de un método de PCR-Simple y uno de PCR-Anidada para el diagnóstico de *M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. fermentans* y *U. urealyticum* en muestras clínicas de pacientes con síntomas respiratorios

#### 4.1.1 Validación de las variantes de la PCR en cepas de referencia

**Cultivos primarios:** De las cepas de referencia de *M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. fermentans* y *U. urealyticum* se obtuvieron cultivos primarios positivos de cada una de ellas, para un 100%. La realización de cultivos primarios en el medio de cultivo F como selectivo para micoplasmas y ureaplasmas, facilita la multiplicación inicial in vitro de especies de micoplasmas y ureaplasmas. Además, estos medios de cultivo contienen antimicrobianos que eliminan o atenúan otros microorganismos que pudieran estar presentes en muestras clínicas. Por otro lado, la realización de cultivos primarios permite diluir inhibidores presentes en las muestras clínicas que pueden interferir en los resultados del diagnóstico, sobre todo si este se realiza por métodos moleculares (Altwegg, 1995; Daxboeck et al., 2003).

**Obtención del ADN:** La metodología de choque osmótico seguido de uno térmico, permitió la obtención de muestras de ADN a partir de los cultivos primarios positivos de las cuatro cepas de referencia. Esta metodología sencilla para la extracción del ADN, se justifica para las especies de mollicutes debido a la carencia de la pared celular en estos microorganismos. Barbeyrac et al., no recomiendan el calentamiento de las muestras para la extracción del ADN, pues no garantiza la eliminación de todos los factores inhibitorios (Barbeyrac et al., 1996). En nuestra investigación no se utilizan muestras clínicas directas, sino que se obtiene cultivos primarios, que ayudan a eliminar y diluir factores inhibitorios presentes en muestras clínicas.

Otros métodos de extracción del ADN están reportados, no solo para micoplasmas y ureaplasmas, sino también para otros microorganismos, los que se basan en pasos de extracción con fenol cloroformo, tampón de lisis y proteínasa K, y los más novedosos se presentan en formatos de estuches comerciales, que pueden o no necesitar de equipamiento semi-automatizado o automatizado, obteniéndose muestras de ADN de alta pureza (Thurman et al., 2009).

#### **4.1.1.1 Método de la PCR-Simple para la detección de la clase *Mollicutes***

En las muestras de ADN, de los cultivos primarios de cepas de referencia, mediante el programa diseñado para la PCR-Simple y utilizando los cebadores complementarios al gen del ARNr 16S de la clase *Mollicutes*, se obtuvieron amplicones con tallas de 1 500 pb en las cuatro cepas en estudio, como se muestran en la figura 1.

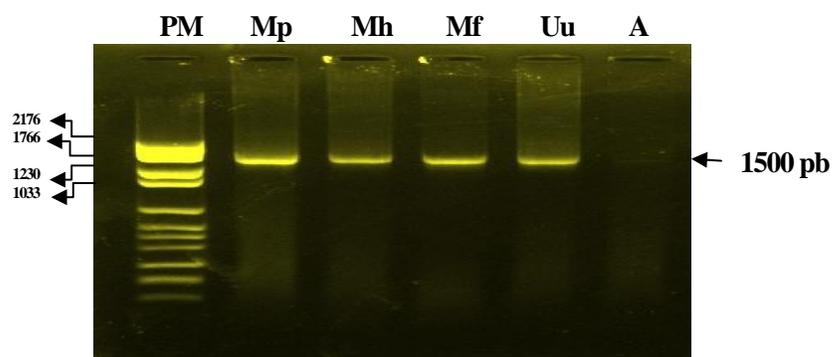


Fig. 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los amplicones de la PCR-Simple para la clase *Mollicutes*. Línea PM patrón de peso molecular VI-Roche, línea Mp cepa de *M. pneumoniae*, línea Mh cepa de *M. hominis*, línea Mf cepa de *M. fermentans*, línea Uu cepa de *U. urealyticum* y línea A muestra de agua.

Los cebadores Moll-1 y Moll-2 están reportados por Deng et al., para el estudio de contaminaciones por especies de mollicutes en líneas celulares (Deng et al., 1992). Estos autores en sus experimentos primero realizan una PCR con los cebadores Moll-1 y Moll-2 para amplificar un fragmento de 1500 pb y posteriormente estos fragmentos son identificados mediante un método basado en cortes con enzimas de restricción, obteniendo patrones de fragmentos diferentes para cada una de las especies de micoplasmas, conocidas como contaminantes de líneas celulares. En nuestra investigación, estos cebadores se utilizan para la detección de mollicutes en muestras de cultivos primarios de cepas de referencia y de muestras clínicas de pacientes con síntomas respiratorios positivos y negativos al VIH.

Shahhosseiny et al., reportan un método de PCR basado en la detección de fragmentos complementarios al gen del ARNr 16S, para la detección de mollicutes con una alta

sensibilidad, especificidad, rapidez y reproducibilidad. (Shahhosseiny et al., 2010). La utilización de este gen se justifica principalmente al utilizar como diana las regiones variables, donde se reporta la mayor especificidad para cada especie de micoplasmas (Johansson et al., 1995).

#### **4.1.1.2 Método de la PCR-Anidada para la identificación de *M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. fermentans* y *U. urealyticum***

Los resultados de las PCR-Anidadas, usando los cebadores especie-específicos del gen del ARNr 16S para cada una de las 4 especies se muestran en la figura 2. Los resultados mostraron amplificaciones de fragmentos de ADN correspondiente a sus secuencias homólogas. Así, se obtuvieron fragmentos de tallas específicas para cada una de las especies. En la figura 2a, se observa una banda de 277 pb con el ADN de *M. pneumoniae* y no con el de otras especies estudiadas, de igual manera en la figura 2b se muestra una banda de 281 pb con el ADN de *M. hominis*, y en las figuras 2c y 2d se observan bandas de 272 pb y 311 pb con los ADN de *M. fermentans* y *U. urealyticum*, respectivamente.

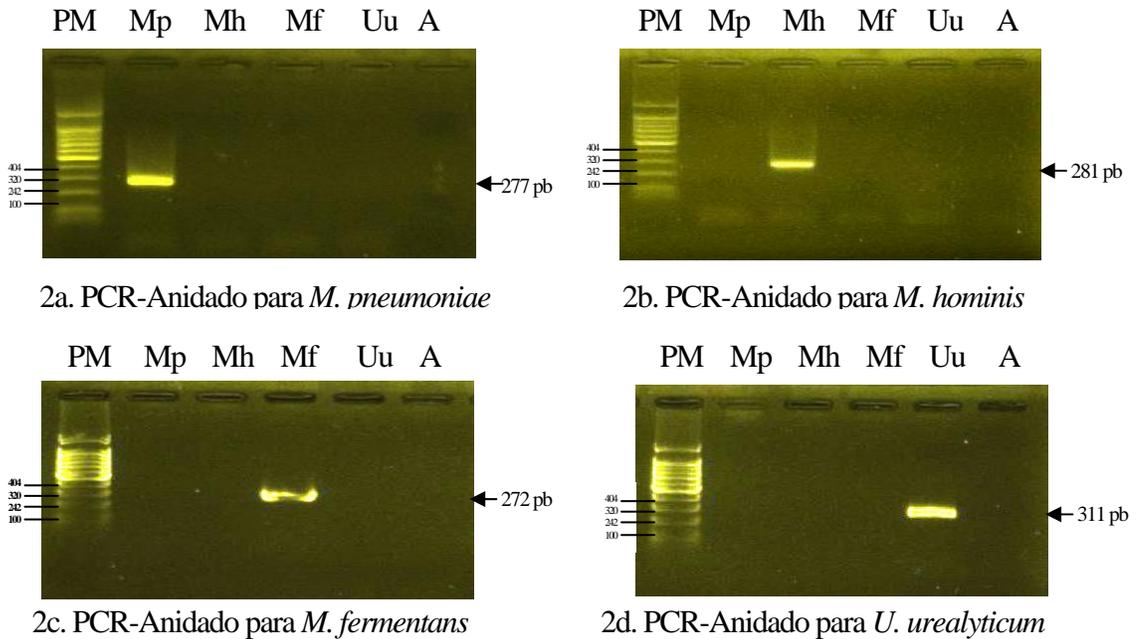


Fig. 2. Electroforesis en geles de agarosa al 2% de los amplicones de las PCR-Anidada para cada especie de mollicutes. Líneas PM Patrón de peso molecular VIII-Roche, líneas Mp cepa de *M. pneumoniae*, líneas Mh cepa de *M. hominis*, líneas Mf cepa de *M. fermentans*, líneas Uu cepa de *U. urealyticum* y líneas A muestra de agua.

van Kuppeveld et al., reportan juegos de cebadores especies-específicos para amplificar fragmentos de regiones variables de gen del ARNr 16S (van Kuppeveld et al., 1992). A partir de este reporte nosotros seleccionamos los juegos de cebadores específicos para *M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. fermentans* y *U. urealyticum* para ser utilizados en una PCR-Anidada especie-específica. Fue necesario diseñar un programa de amplificación a partir de las Tm conocidas de cada cebador y las tallas de los fragmentos a amplificar por la PCR-Anidada. Con el programa y las demás condiciones establecidas se identifican por separado cada una de las cepas de referencia seleccionadas en esta investigación, como se observa en la figura 2.

El gen del ARNr 16S es ampliamente utilizado como diana para el diagnóstico molecular de infecciones por micoplasmas, así como también para estudios filogenéticos (McAuliffe

et al., 2003). Hashimoto et al., realizan un estudio en pacientes seropositivos al VIH para la detección de especies de micoplasmas y ureaplasmas, combinando un método de PCR basado en el gen ARNr 16S y la secuenciación de los amplicones obtenidos, para el posterior análisis filogenéticos; como resultados obtienen 15 prototipos de cepas correspondientes a: *M. genitalium* (11,2%), *M. hominis* (5,9%) y *U. urealyticum* (70,6%); demostrando la factibilidad de utilizar la molécula del ARNr 16S como diana para el diagnóstico de infecciones y estudios filogenéticos sobre estos microorganismos (Hashimoto et al., 2006).

Otros métodos de PCR-Anidada están reportados para la detección de especies de micoplasmas por varios autores (Nadal et al., 2001; Sung et al., 2006; Yang et al., 2010 y Cheong et al., 2011). Uno de estos métodos de PCR-Anidada se desarrolla para la detección de 13 especies de micoplasmas en muestras de cultivo de células, detectando de una a dos copias del ADN diana sin evidenciar reacciones cruzadas con otros microorganismos, por lo que se sugiere la utilización de la PCR-Anidada como una herramienta efectiva para el diagnóstico de contaminaciones por micoplasmas (Sung et al., 2006).

#### **4.1.2 Estimación de frecuencia de micoplasmas y ureaplasmas en muestras clínicas de pacientes con síntomas respiratorios**

De las 172 muestras de esputo estudiadas, se obtuvieron por cambio de coloración 54 (31,4%) cultivos primarios positivos y de ellos 48 (89%) fueron positivos a la clase *Mollicutes* por la PCR-Simple, correspondiendo significativamente el mayor porcentaje a pacientes positivos al VIH, en los que se registró una frecuencia de infección por

micoplasmas cinco veces mayor que en los paciente negativos al VIH (RP = 5,08, IC 95% 2,40 – 10,74). Estos resultados se muestran en la tabla 13.

Tabla 13: Detección de la clase *Mollicutes* en muestras de pacientes con síntomas respiratorios positivos y negativos al VIH.

Grupo de pacientes	Clase <i>Mollicutes</i>				Valor de <i>p</i>	RP (IC-95%)
	Positivos		Negativos			
	n	%	n	%		
<b>Positivos al VIH</b>	36	75,0	46	37,1	0,000	5,08 (2,40-10,74)
<b>Negativos al VIH</b>	12	25,0	78	62,9		
<b>Total</b>	48	100,0	124	100,0		

Fuente: LNRIM-IPK

La alta positividad de micoplasmas y ureaplasmas en pacientes positivos al VIH (75%) con síntomas respiratorios fue significativamente tres veces mayor que en el grupo de pacientes negativos al VIH (25%) con iguales síntomas. Estos resultados son mayores a los reportados por Shankar et al., quienes encontraron una frecuencia dos veces mayor de especies de micoplasmas en el tracto respiratorio de pacientes positivos al VIH (36%) que en los negativos al VIH (16,6%) (Shankar et al., 2005). Numerosas observaciones reportan la existencia de varias especies de mollicutes como cofactores en el desarrollo del sida en pacientes positivos al VIH (Lo, 1992; Montagnier et al., 1993; Waites y Taylor-Robinson, 2007).

En nuestro estudio por la PCR-Anidada se identifican las especies de micoplasmas y ureaplasmas en el 70,8% (34/48) de las muestras clínicas, mientras el 29,2% (14/48) no se identificaron.

En la tabla 14 se muestran los resultados de la identificación por la PCR-Múltiple de las especies de mollicutes, según los grupos de pacientes con síntomas respiratorios positivos y negativos al VIH. Obsérvese que la especie *M. hominis* se identificó con mayor frecuencia (36,1%) en los pacientes positivos al VIH, mientras que *M. pneumoniae* fue la de mayor frecuencia (75%) en los pacientes negativos a este virus, resultados estadísticamente significativos. Otras especies que solo se identificaron en los pacientes positivos al VIH fueron *M. fermentans* (5,6%) y *U. urealyticum* (5,6%). Además, existió coinfección en ambos grupos de pacientes entre *U. urealyticum* y *M. pneumoniae* y entre *U. urealyticum* y *M. hominis*; quedando la mayor frecuencia de especies (36,1%) sin identificar en el grupo de pacientes positivos al VIH.

Tabla 14. Frecuencia de especies de micoplasmas y ureaplasmas en pacientes positivos a la clase *Mollicutes*.

Especies	Grupo de pacientes				Valor de <i>p</i>
	VIH positivos		VIH negativos		
	n	%	n	%	
<i>M. pneumoniae</i>	1	2,7	9	75,0	0,000
<i>M. hominis</i>	13	36,1	0	0	0,014
<i>M. fermentans</i>	2	5,6	0	0	0,404
<i>U. urealyticum</i>	2	5,6	0	0	0,404
<i>U. urealyticum</i> y <i>M. pneumoniae</i>	2	5,6	1	8,3	0,730
<i>U. urealyticum</i> y <i>M. hominis</i>	3	8,3	1	8,3	1,000
Especies no identificadas	13	36,1	1	8,3	0,667
Total	36	100	12	100	

Fuente: LNRIM-IPK

Desde el año 1998, Cultrera et al., detectan por PCR las especies de *M. fermentans* y *M. salivarium* en muestras de esputo y lavados bronquiales de pacientes positivos al VIH, además de *M. hominis* y *U. urealyticum*, resaltando que estas dos últimas especies es un hallazgo no esperado, por ser especies del tracto urogenital, y sugieren que éstas pueden tener un rol en determinar o exacerbar infecciones del trato respiratorio en pacientes positivos al VIH (Cultrera et al., 1998).

Ainsworth et al., realizan un estudio para la detección de *M. fermentans* en muestras de lavados bronquiales y en muestras de sangre de pacientes positivos al VIH, y demuestran que esta especie pueden presentarse como oportunista y causar enfermedades en pacientes inmunodeprimidos (Ainsworth et al., 2000).

En nuestro estudio *M. pneumoniae* se detecta en un 2,7% de los pacientes positivos al VIH, lo que difiere de lo reportado por Nadagir et al., quienes a través de un sistema ELISA-IgM detectan un 32% de muestras positivas a *M. pneumoniae* en pacientes de edad pediátrica infectados con el VIH (Nadagir et al., 2010). Estas diferencias se explican por el tipo de muestra, método de detección y edades de los pacientes, que difieren en cada estudio.

*M. hominis*, *M. fermentans*, *M. penetrans*, *M. pirum* y *M. genitalium*, son especies aisladas de pacientes positivos al VIH (Grau et al, 1993; Waites y Taylor-Robinson, 2007; McGowin et al., 2009; Jian-Ru et al., 2011). En nuestro estudio se identifican dos de estas especies (*M. hominis* y *M. fermentans*), las otras tres no son identificadas, las que pueden estar incluidas en el 36,1% de muestras no identificadas, como se muestra en la tabla 13.

Con relación al diagnóstico de infecciones por micoplasmas, varios métodos microbiológicos son reportados y evaluados, siendo la PCR la de mejores resultados y recomendada para el diagnóstico de infecciones por estos microorganismos (Amores et al., 2010). Uno de los estudios realizado es el de She et al., quienes comparan métodos de cultivo, serológicos para IgM y PCR, para el diagnóstico de *M. pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae*. Estos autores demuestran la baja sensibilidad y el bajo rendimiento del cultivo, concluyendo en su trabajo que el diagnóstico de estos patógenos no es recomendado realizarlo por el método de cultivo, y debe ser eliminado del diagnóstico de rutina (She et al., 2010).

#### **4.2 Desarrollo de un método de PCR-Múltiple para el diagnóstico de *U. parvum* y *U. urealyticum* e identificación de la frecuencia de estas especies y de *M. hominis* en el tracto genital de mujeres infértiles y fértiles**

##### **4.2.1 Validación del método de la PCR-Múltiple para *U. parvum* y *U. urealyticum***

###### **4.2.1.1 Métodos de la PCR-Simple para *U. parvum* y *U. urealyticum***

Para la amplificación de ADN por las PCR-Simple en estudio se evaluaron dos programas, con el #1 (Ta 55°C) se obtuvieron fragmentos específicos de ADN en el PCR-Simple para *U. parvum*, mientras en el PCR-Simple para *U. urealyticum* se obtuvieron fragmentos inespecíficos. Al aumentar la Ta a 57°C, correspondiente al programa #2, en la PCR-Simple para *U. parvum* se mantuvo la amplificación de fragmentos de 812 pb con el ADN

de *U. parvum* (figura 3a) y en la PCR-Simple de *U. urealyticum* se logró la amplificación solo de fragmentos de 418 pb con el ADN de *U. urealyticum* (figura 3b).

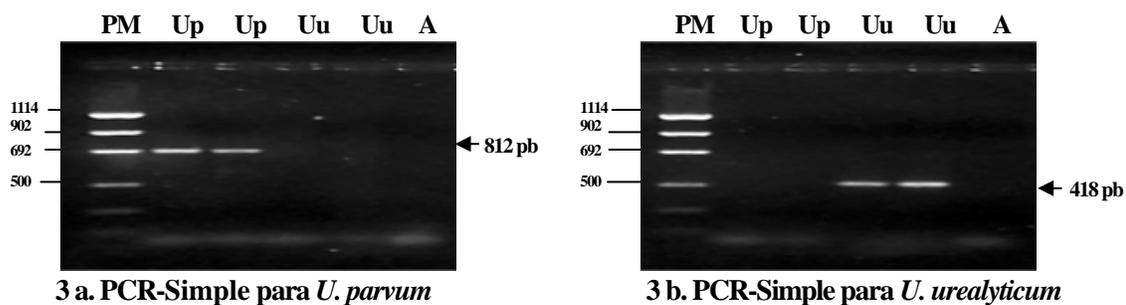


Fig. 3. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de las PCR-Simple. Líneas PM patrón de peso molecular VIII-Roche, líneas Up cepa de *U. parvum*, líneas Uu cepa de *U. urealyticum* y líneas A muestra de agua.

Con estos resultados se demuestran que en dependencia de las  $T_m$  de los cebadores y las  $T_a$  seleccionadas para los programas de la PCR, se obtienen fragmentos de ADN de mayor especificidad (Saiki et al., 1985; Sambrook et al., 1989<sub>a</sub>; Bacich, 2011).

#### 4.2.1.2 Método de la PCR-Múltiple para *U. parvum* y *U. urealyticum*

En la PCR-Múltiple, al utilizar en una misma reacción los dos juegos de cebadores específicos para *U. parvum* y *U. urealyticum* y la  $T_a$  de 57°C, se obtuvieron amplificaciones de fragmentos con tallas de 812 pb con el ADN de *U. parvum* y fragmentos de 418 pb en el ADN de *U. urealyticum*, como se muestra en la figura 4.

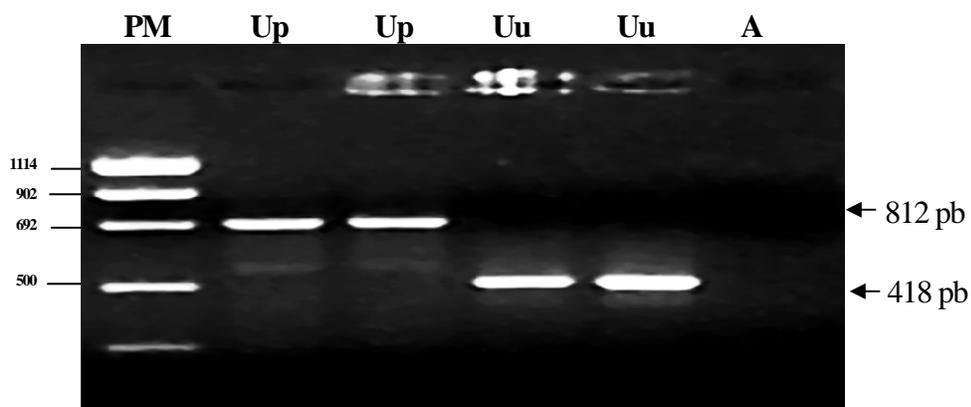


Fig. 4. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de las PCR-Múltiple. Línea PM patrón de peso molecular VIII-Roche, líneas Up cepa de *U. parvum*, líneas Uu cepa de *U. urealyticum*, línea A muestra de agua.

Los resultados que se obtiene por la PCR-Múltiple realizada en esta investigación coinciden con lo reportado por Kong et al., quienes le confirieron gran importancia a los cebadores complementarios a regiones espaciadoras, las que muestran mayor heterogeneidad entre las especies de un mismo género (Kong et al., 2000). Además, en la tesis se demuestra que la selección de cebadores complementarios a regiones de genes diferentes, facilita la identificación de las especies por electroforesis en geles de agarosa, según la talla de los fragmentos amplificados.

De seleccionar juegos de cebadores para cada una de las especies y complementarios a una misma región, se obtienen fragmentos de ADN con tallas similares o iguales, aunque con secuencias diferentes, siendo necesario realizar otras técnicas moleculares, como secuenciaciones de ADN o cortes con enzima de restricción para la identificación de las especies (Pitcher et al., 2001).

Gupta et al., reportan un método de PCR-Múltiple para amplificar fragmentos de 448 pb y 403 pb, específicos para *U. parvum* y *U. urealyticum*, respectivamente, y complementarios ambos al gen *mba* como molécula diana (Gupta et al., 2008). En nuestro estudio, con los cebadores seleccionados complementarios a genes diferentes, se obtienen fragmentos de tallas distantes (812 pb y 418 pb), lo que permite identificar las especies con mayor facilidad mediante electroforesis submarina.

Cao et al., Yoshida et al. y Xiao et al., refieren un método de PCR en Tiempo Real (PCR-TR) para la detección, identificación y cuantificación de *U. urealyticum* y *U. parvum* con mayor sensibilidad y rapidez, al compararlo con los métodos de cultivo y la PCR convencional, y reportan la utilidad de la PCR-TR en estudios sobre la patogénesis y la epidemiología de las infecciones por ureaplasmas en el humano (Cao et al., 2007; Yoshida et al., 2007; Xiao et al., 2010).

#### **4.2.2 Identificación de la frecuencia de *U. parvum*, *U. urealyticum* y *M. hominis*, en muestras clínicas de mujeres infértiles y fértiles**

En la tabla 15 se muestran los resultados de la distribución porcentual de micoplasmas urogenitales por grupos de estudio, vea que fueron positivas a micoplasmas urogenitales el 68% y el 35% de mujeres infértiles y fértiles, respectivamente, siendo la frecuencia de infección por micoplasmas y ureaplasmas tres veces mayor en las mujeres infértiles con respecto a las fértiles (RP = 3,88, IC 95% 2,40 – 6,28).

Tabla 15. Distribución porcentual de micoplasmas urogenitales por grupos de estudio.

Detección de micoplasmas urogenitales	Grupos de estudio				Valor de <i>p</i>	RP (IC-95%)
	Mujeres infértiles		Mujeres fértiles			
	n	%	n	%		
Positivas	102	68,0	53	35,0	0,0000	3,88 (2,40-6,28)
Negativas	48	32,0	97	65,0		
Total	150	100,0	150	100,0		

Fuente: LNRIM-IPK

La mayor frecuencia de micoplasmas urogenitales en el grupo de pacientes infértiles, coincide con lo reportado en la literatura sobre el tema de infertilidad e infecciones por micoplasmas y ureaplasmas. Fenkci et al., reportan un 56% y 39% de frecuencia de micoplasmas urogenitales en mujeres infértiles y fértiles, respectivamente (Fenkci et al., 2002), lo que coincide con nuestros resultados.

El estuche comercial MFE-2, ver figura 5, refiere el diagnóstico de *M. hominis* y *U. urealyticum*, utilizando la antigua clasificación taxonómica sobre *U. urealyticum*, que incluye el biovar parvum y biovar T960, con 4 y 10 serovariantes, respectivamente.

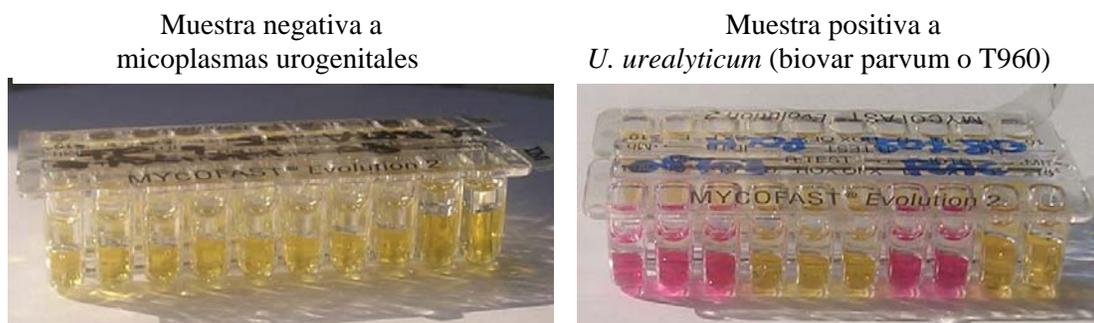


Fig. 5. Galerías del estuche comercial MFE-2 para el diagnóstico de *M. hominis* y *U. urealyticum*.

En el año 2000 se reconoce al biovar parvum como *U. parvum* con 4 serovariedades y al biovar T960 como *U. urealyticum* con 10 serovariedades. Por lo que mediante los métodos de cultivo bacteriológico y estuches de diagnósticos comerciales, como el MFE-2, el resultado obtenido solo refiere la identificación del género *Ureaplasma*, siendo necesario la identificación de las especies por métodos moleculares basados en el ADN o anticuerpos monoclonales (Kong et al., 2000).

En la tabla 16 se muestran los resultados de la frecuencia de especies de micoplasmas y ureaplasmas en mujeres infértiles y fértiles, según los métodos de laboratorios utilizados. Obsérvese que la frecuencia de *U. parvum* (38%) y *U. urealyticum* (22,6%) fue mayor en mujeres infértiles, mientras *M. hominis* (30,7%) fue la de mayor frecuencia en las mujeres fértiles, resultados que mostraron diferencias estadísticamente significativa. Por último, prevaleció el mayor hallazgo de negatividad a micoplasmas y ureaplasmas en las mujeres fértiles (64,7%) con respecto a las infértiles (32%), existiendo de igual manera diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 16. Frecuencia de especies de micoplasmas y ureaplasmas en mujeres infértiles y fértiles, según los métodos de laboratorios utilizados.

Especies	Grupos de estudio				Valor de <i>p</i>
	Mujeres infértiles		Mujeres fértiles		
	n	%	n	%	
<i>U. parvum</i>	57	38,0	5	3,3	0,000
<i>U. urealyticum</i>	34	22,6	2	1,3	0,000
<i>M. hominis</i>	10	6,7	46	30,7	0,000
<i>M. hominis</i> y <i>Ureaplasma</i> spp.	1	0,7	0	0	1,000
Negativas	48	32,0	97	64,7	0,000
Total	150	100,0	150	100,0	

Fuente: LNRIM-IPK

Desde el año 1998, Elías et al. reportan el 18,2% de *U. urealyticum* (biovar parvum o T960) y el 3% de *M. hominis* en exudados endocervicales, de 33 mujeres con el diagnóstico de infertilidad (Elías et al., 1998). Por otra parte, Witkin et al. detectan que el 62.1% de las muestras endocervicales de mujeres infértiles presentaban *U. urealyticum* (biovar parvum o T960) y en el 2.1% *M. hominis* (Witkin et al., 2000). En el 2008, Imudia et al., reportan en pacientes infértiles mayor frecuencia (20,1%) de *U. urealyticum* (biovar parvum o T960), con relación a *M. hominis* (1,3%) (Imudia et al., 2008). Estos reportes, coinciden con los resultados presentados en esta tesis.

Debattista et al., obtienen un 28,2% de *U. parvum* en mujeres infértiles y no identifican *M. hominis* (Debattista et al., 2004). Otros investigadores, como Borovkova et al. en el 2011, realizan un estudio de la microbiota del tracto genital de parejas infértiles, y encuentran mayor infección a *U. parvum* (59%) (Borovkova et al., 2011). Estos resultados coinciden con los obtenidos en esta tesis.

En la literatura consultada, *U. parvum* se detecta con mayor frecuencia en mujeres infértiles, sin embargo en hombres infértiles Zeighami et al., reportan una prevalencia mayor de *U. urealyticum* (9%) que de *U. parvum* (3%) (Zeighami et al., 2009).

En esta tesis, la frecuencia de *M. hominis* fue mayor en mujeres fértiles, estos resultados coinciden con lo reportado por Elías et al., Witkin et al., Debattista et al. e Imudia et al. (Elías et al., 1998; Witkin et al., 2000; Debattista et al., 2004; Imudia et al., 2008).

### 4.3 Desarrollo de un método de PCR-Simple para el diagnóstico de *M. genitalium*

#### 4.3.1 Método de PCR-Simple para *M. genitalium*

##### Ensayo de especificidad de la PCR-Simple para *M. genitalium*

Por la PCR-Simple al amplificar el ADN de referencia de *M. genitalium* con los cebadores específicos para el gen del ARNr 16S (MGF-MGR) se obtuvieron fragmentos de 427 pb (figura 6A), a su vez con los cebadores del gen de la proteína de adhesión (MgPaF-MgPaR) se obtuvieron fragmentos de 78 pb (figura 6B). No se visualizaron amplificaciones en las muestras de ADN de las cepas de *M. hominis*, *U. parvum* y *U. urealyticum* (figuras 6A y 6B), lo que confirma la especificidad de la PCR-Simple utilizada.

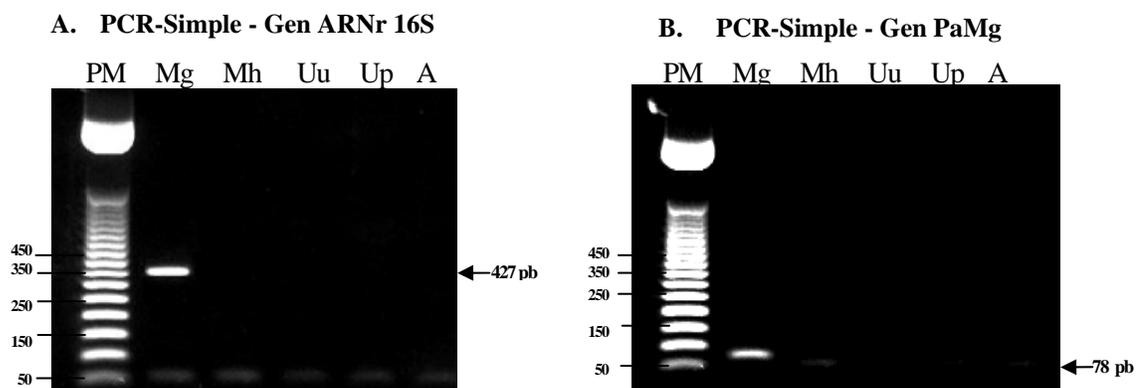


Fig. 6. Electroforesis en gel de agarosa al 4% de los productos de las PCR-Simple. Líneas PM patrón de peso molecular de 50 pb - Invitrogen, líneas Mg cepa de *M. genitalium*, líneas Mh cepa de *M. hominis*, líneas Up cepa de *U. parvum*, líneas Uu cepa de *U. urealyticum* y líneas A muestra de agua.

El programa de amplificación diseñado y las concentraciones de las mezclas de reacciones para los dos juegos de cebadores MGF-MGR y MgPaF-MgPaR, permiten obtener resultados de especificidad que coinciden con los reportes realizados en el 2003 y en el

2004 por Jensen et al. Estos autores utilizan los dos juegos de cebadores para amplificar fragmentos específicos del gen del ARNr 16S y del gen *mgpa* de la proteína de adhesión de *M. genitalium* (Jensen et al., 2003; Jensen et al., 2004).

### Sensibilidad la PCR-Simple para *M. genitalium*

En la figura 7 se muestra los resultados de las dos PCR-Simple a partir de las diluciones del ADN de referencia de *M. genitalium*, véase que se obtuvieron bandas de amplificaciones hasta una concentración de 1,2 fg/ $\mu$ L con los cebadores del gen del ARNr 16S (figura 7A), que corresponde a tres copias del genoma/ $\mu$ L, mientras que con los cebadores del gen de la PaMg se obtuvo amplificación hasta 12 fg/ $\mu$ L (figura B), correspondiendo a 30 copias de genoma/ $\mu$ L.

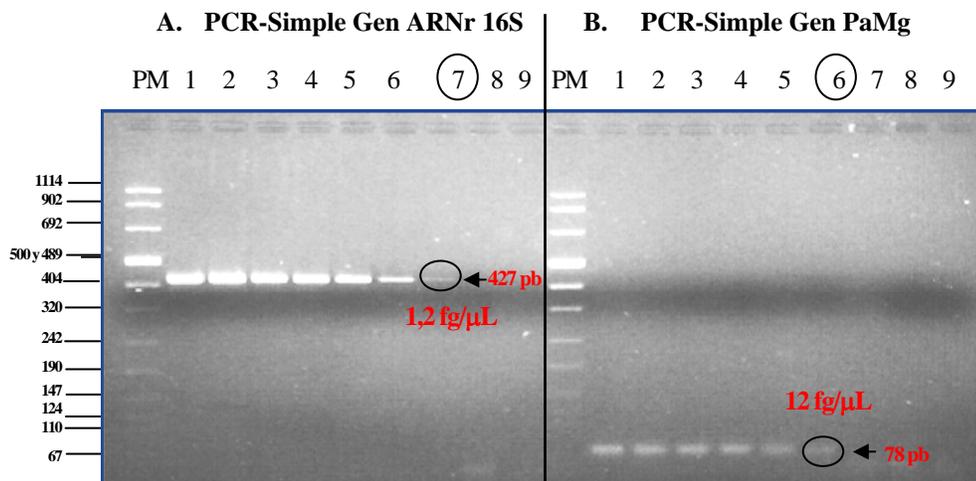


Fig. 7. Electroforesis en gel de agarosa al 4% de los productos de las PCR-Simple. Líneas PM patrón de peso molecular VIII-Roche, líneas de la 1 a la 8 concentraciones de ADN de *M. genitalium* y líneas 9 agua.

El ensayo de la PCR-Simple, con muestras de ADN de referencia, es diez veces más sensible con el juego de cebadores del ARNr 16S que con el juego de cebadores del gen de

la proteína de adhesión. En muestras de ADN de referencia se describe que la secuencia del gen del ARNr 16S es relativamente estable y por tanto contiene pocos o ningún polimorfismo en la población de *M. genitalium*. Sin embargo, los antígenos expresados en la superficie muchas veces tienen secuencias de genes inestables, y se reporta estas variaciones en el gen de la proteína MgPa de *M. genitalium* (Edberg et al., 2008). Este análisis es válido en la interpretación de nuestros resultados.

#### 4.3.2 Identificación mediante la PCR-Simple de *M. genitalium* en muestras clínicas de hombres con uretritis no gonocócica

De las muestras clínicas de exudado uretral estudiadas el 79,4% (27/34) fueron positivas a la clase *Mollicutes*. En la figura 8 se observan las muestras positivas a *M. genitalium* por la PCR-Simple con el juego de cebadores complementarios al gen del ARNr 16S, por donde se obtuvieron el 7,4% (2/27) de muestras positivas a *M. genitalium*, mientras por la PCR-Simple con los cebadores del gen *mgpa* se obtuvieron el 14,8% (4/27) de muestras positivas a *M. genitalium*.

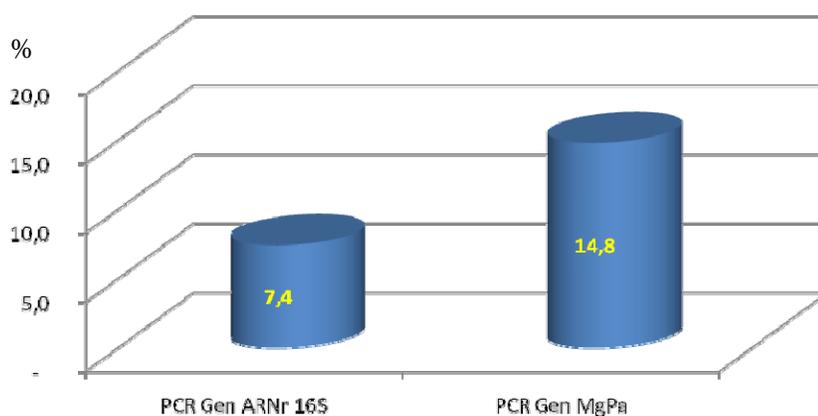


Fig. 8. Muestras positivas por las PCR-Simple utilizando los juegos de cebadores complementarios al gen del ARNr 16S y al gen *mgpa* de *M. genitalium*.

Nuestros resultado coinciden con el reporte realizado por Hardick et al. y Shipitsyna et al, quienes desarrollan un método de PCR para múltiples genes como diana y encuentran un mayor número de muestras positivas al utilizar la región del gen *mgpa* (Hardick et al., 2006; Shipitsyna et al., 2009).

Edberg et al., realizan un estudio comparativo entre tres métodos: PCR-ARNr 16S, PCR-TR-ARNr 16S y PCR-TR *mgpa* para la detección de *M. genitalium* en muestras clínicas, y demuestran que la región diana del ARNr 16S es menos sensible para la detección de *M. genitalium* en muestras clínicas con respecto a otros sitios, como el de la proteína de adhesión MgPa, con la que se obtienen los mejores resultados de sensibilidad y especificidad mediante la PCR en Tiempo Real (Edberg et al., 2008).

Manash et al., utilizan un método de PCR para el gen *mgpa* y detectan *M. genitalium* con mayor frecuencia en casos con UNG y positivos al VIH (7,7%) que en los casos negativos al VIH (3,3%). Estos autores demuestran que los pacientes con UNG tienen mas riesgo de ser infectados por micoplasmas genitales, independientemente de ser positivo o negativo al VIH (Manash et al., 2009).

Nuestros resultados coinciden con la necesidad de establecer en la práctica clínica el diagnóstico de *M. genitalium* en los pacientes con UNG, mediante la amplificación del ADN por la PCR utilizando los juegos de cebadores complementarios al gen de la proteína de adhesión.

#### 4.4 Desarrollo de una PCR-Múltiple para identificar *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. parvum* y *U. urealyticum* y conocer la frecuencia de estas especies en pacientes con síntomas urogenitales

##### 4.4.1 Método de PCR-Múltiple para la identificación de *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum* y *U. parvum* con ADN de referencia

En la amplificación del ADN de las cepas de referencia por el método de la PCR-Múltiple, con los programas #1 (Ta 55°C) y #3 (Ta 60°C) no se lograron amplificaciones al unísono de fragmentos específicos de las cuatro muestras del ADN de referencia. Sin embargo, con el programa #2 (Ta 57°C) se obtuvieron resultados específicos para cada ADN de las cepas de referencia estudiadas (figura 9), visualizándose fragmentos de 812 pb en el ADN de *U. parvum*, fragmentos de 418 pb en el ADN de *U. urealyticum*, fragmentos de 280 pb en el ADN de *M. hominis* y fragmentos de 78 pb en el ADN de *M. genitalium*.

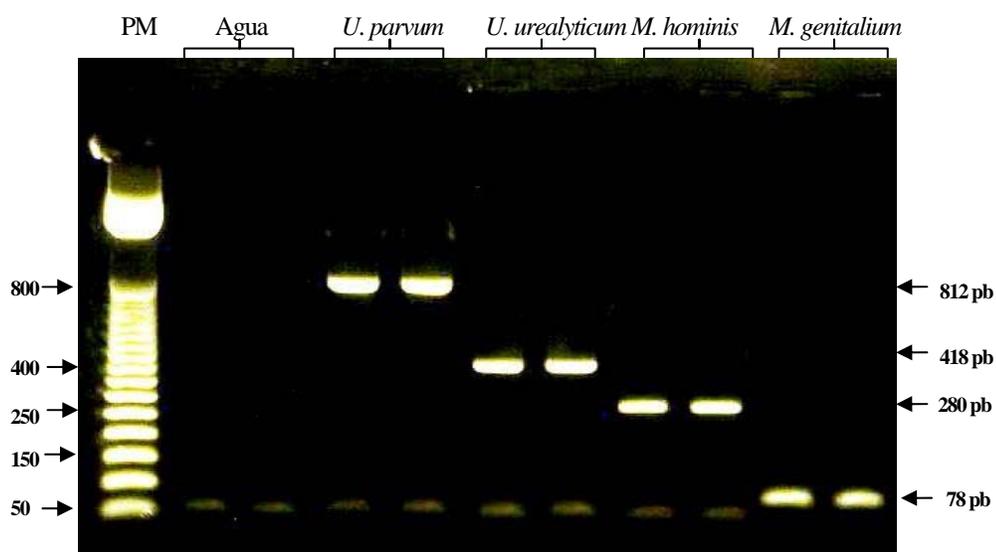


Fig. 9. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los amplicones de PCR-Múltiple. Línea PM Patrón de peso molecular de 50 pb - Invitrogen.

Los resultados que se obtienen confirman la factibilidad de la PCR-Múltiple como una herramienta para la identificación de especies bacterianas, e incluso de virus y parásitos, según lo reportan McIver et al. (McIver et al., 2009)

Vojdani et al., desarrollan una PCR-Múltiple para detectar *M. fermentans*, *M. hominis* y *M. penetrans* en pacientes con síndrome de fatiga crónica, fibromialgia, artritis reumatoide, y síndrome de la guerra del golfo, este ensayo rápido y eficiente permite detectar estas tres especies de micoplasmas, potencialmente patógenas, en muestras clínicas (Vojdani et al. 1999).

Numerosos autores utilizan los métodos de diagnósticos basados en la PCR-Múltiple para la identificación de especies de micoplasmas y ureaplasmas asociadas con infecciones del tracto genitourinario, en los que se reportan una alta sensibilidad y especificidad al compararlos con otros métodos de diagnósticos, considerando a la PCR-Múltiple una herramienta eficaz para la identificación de estos microorganismos. (Stellrecht et al., 2004; Daxboeck et al., 2005; Workowski y Berman, 2006; Takahashi et al., 2006; Shim et al., 2010; Díaz et al., 2010; Kim et al., 2011).

#### **4.4.2 Estimación de la frecuencia de la *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. parvum* y *U. urealyticum* en muestras clínicas de mujeres y hombres con síntomas urogenitales**

##### **Muestras clínicas de mujeres**

De los cultivos primarios, correspondientes a las muestras clínicas de las mujeres con síntomas urogenitales, el 94% (47/50) fueron positivos a la clase *Mollicutes* y el 6% (3/50)

fueron negativos. En las muestras positivas a mollicutes se identificó la especie infectante en el 91,5% (43/47), mientras que el 8,5% (4/47) quedó sin identificar.

En la figura 10 se muestran los resultados de la identificación de la especie de micoplasmas y ureaplasmas realizada por la PCR-Múltiple, donde *U. parvum* fue la especie de mayor frecuencia identificada (74,5%), con un porcentaje mayor que el de *M. hominis* (6,4%) y *M. genitalium* (6,4%), seguido por *U. urealyticum* (2,1%).

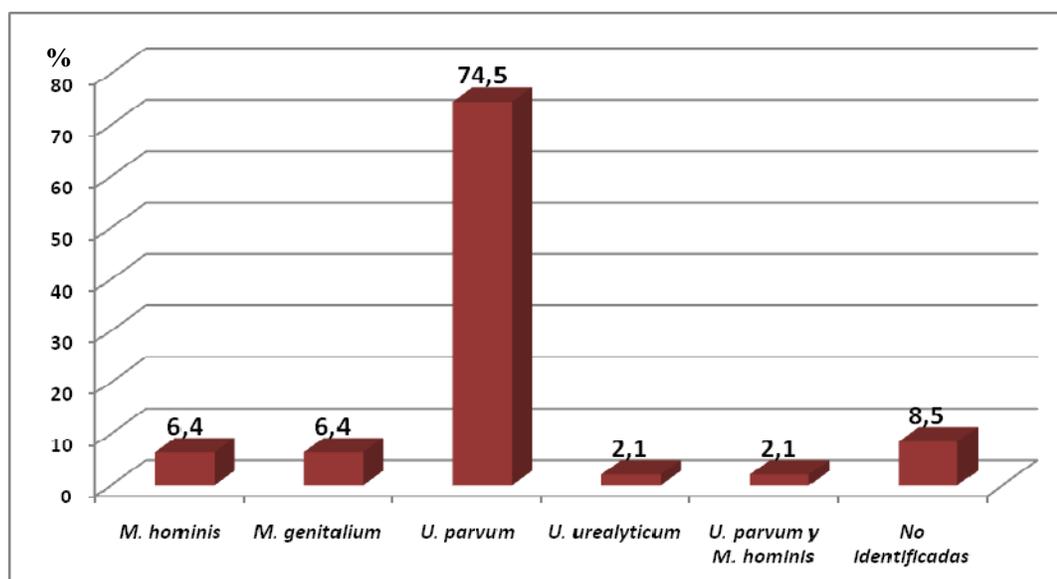


Fig. 10. Frecuencia de especies de micoplasmas y ureaplasmas en mujeres con síntomas urogenitales. LNRIM-IPK, 2009.

De Francesco et al., desarrollan un método de PCR para identificar en cultivos de muestras de exudado endocervical positivos a ureaplasmas, las especies de *U. parvum* y *U. urealyticum*, referidos como biovar Parvo y T960, respectivamente. Estos autores encuentran *U. parvum* en el 86% de las muestras y *U. urealyticum* en el 14% (De

Francesco et al., 2009). Estos resultados coinciden con los de nuestro estudio, donde el mayor porcentaje detectado corresponde a *U. parvum* (74,5%) y el menor a *U. urealyticum* (2,1%).

Abelé-Horn et al., Kong et al. y Picther et al., también encuentran en sus estudios a *U. parvum* con mayor frecuencia que *U. urealyticum* (Abelé-Horn et al., 1997; Kong et al., 1999; Picther et al., 2001).

La frecuencia de detección de *M. genitalium* encontrada en nuestro trabajo en las mujeres con síntomas urogenitales (6,4%), coincide con la determinada por Anagrius et al., los que encuentran un 6,3% de muestras positivas de un total de 405 mujeres estudiadas (Anagrius et al., 2008).

En un estudio realizado por Gaydos et al., encontrn a *M. genitalium* como el agente infeccioso de mayor prevalencia en mujeres con cervicitis (Gaydos et al., 2009); mientras que Kataoka et al., estudiando mujeres embarazadas con amenaza de parto prematuro reportan un 0,8% de positividad a *M. genitalium* (Kataoka et al., 2006).

En el grupo de muestras positivas a la clase *Mollicutes*, en las que no se identificaron las especies de micoplasmas (8,5%), pueden estar incluidas otras especies tales como *M. fermentans*, *M. primatum*, *M. spermatophilum* y *M. pirum*, inclusive *M. pneumoniae*, que aunque esta última es una especie del tracto respiratorio, puede causar infecciones urogenitales (Waites y Talkington, 2004; Waites y Taylor-Robinson, 2007).

### Muestras clínicas de hombres

De los cultivos primarios correspondientes a las muestras clínicas de los hombres con UNG el 79,4% (27/34) fueron positivas a la clase *Mollicutes* y el 20,6% (7/34) fueron negativas.

Manash et al., en un estudio sobre micoplasmas genitales en hombres con UNG utilizan métodos bacteriológicos para el diagnóstico de *M. hominis* y *U. urealyticum*, y de PCR para el diagnóstico de *M. genitalium*. Estos autores obtienen un 6% de muestras positivas a micoplasmas urogenitales (Manash et al. 2009). En nuestro estudio se reporta el 79,4% de positividad, cifra superior a la reportada por estos autores. Numerosos factores pueden influir en las diferencias encontradas, entre estos se pueden citar los métodos de laboratorio utilizados, como la PCR-Simple y PCR-Múltiple, que son sensibles, específicos, rápidos y fáciles para identificar micoplasmas urogenitales en muestras clínicas (Stellrecht et al., 2004, Workowski y Berman, 2006; Shim et al., 2010).

En la figura 11 se muestran los resultados de la identificación por la PCR-Múltiple de las especies de micoplasmas y ureaplasmas identificadas. *M. hominis* fue la especie de mayor frecuencia (18,5%), seguida de *M. genitalium* (14,8%), *U. urealyticum* (11,1%) y *U. parvum* (3,7%), además de un grupo de muestras con coinfección entre *U. parvum* y *M. hominis* (7,4%). El 44,5% correspondió a muestras en las que no se identificaron las especies en estudio.

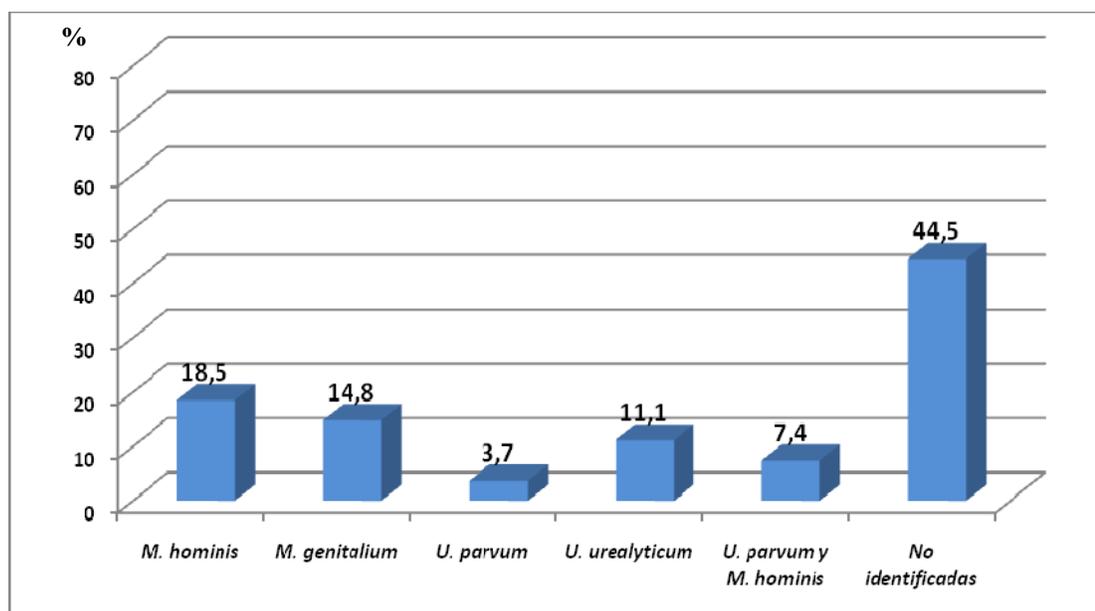


Fig. 11. Frecuencia de especies de micoplasmas y ureaplasmas en hombres con uretritis no gonocócica. LNRIM-IPK, 2009.

Amirmozafari et al. y Férandon et al., realizan estudios de comparación entre los métodos de cultivo y los de la PCR para la detección de especies de micoplasmas genitales (*M. hominis*, *M. genitalium* y *U. urealyticum*) en muestras clínicas de pacientes con infecciones urogenitales. Estos autores obtienen mayor sensibilidad por el método de la PCR y recomiendan su uso para el diagnóstico de infecciones por micoplasmas (Amirmozafari et al., 2009; Férandon et al., 2011).

En nuestra investigación se detecta con mayor frecuencia *M. hominis*; esta especie es la primera aislada en humanos y frecuente el tracto genital femenino (Cedillo-Ramirez et al., 2000). Esta especie puede ser transmitida al hombre por contacto sexual y ser causa, no solo de UNG, sino también de otras infecciones urogenitales (Keane et al., 1997). Por otro lado, en estudios realizados por Barykova et al. en el 2010 y el 2011, se detecta *M. hominis*

con mayor frecuencia en pacientes con cáncer de próstata (CaP) (Barykova et al., 2010; Barykova et al., 2011). Estos resultados, junto a hallazgos anteriores sobre la relación de micoplasmas y el sistema inmunológicos (Namiki et al., 2009), sugieren que la infección por micoplasmas pueda estar involucrada con el desarrollo de CaP, y por consiguiente el diagnóstico oportuno de estos microorganismo pueden ser un marcador potencial para la prevención y tratamiento de esta enfermedad (Barykova et al., 2011).

Con relación a los resultados de un 14,8% de positividad a *M. genitalium*, esto coincide con lo reportado por Gubelin et al. , quienes mediante un método de PCR detectan esta especie en el 13,04% de los pacientes con UNG (Gubelin et al., 2006).

*U. urealyticum*, se identifica en un 11,1% de las muestras, siendo otra de las especies de ureaplasma reportada con mayor frecuencia en pacientes con UNG. Deguchi et al., realizan un estudio para determinar la asociación entre las especies de ureaplasma y UNG, y encuentran un mayor porcentaje en muestras positivas a *U. urealyticum* (15,8%) que a *U. parvum* (8,5%), y concluyen que *U. urealyticum* puede jugar un potencial patogénico en el desarrollo de la UNG en hombres (Deguchi et al., 2004). Estos resultados coinciden con los obtenidos en esta tesis, y con el reporte de Couldwell et al. en el 2010, quienes incluyen en su estudio hombres heterosexuales con UNG y encuentran también mayor positividad a *U. urealyticum* con relación a *U. parvum* (Couldwell et al., 2010).

Keane et al. y Manhas et al., realizan estudios para conocer la asociación de micoplasmas urogenitales en pacientes con UNG positivos al VIH; y encuentran igual riesgo de ser

infectados con *M. genitalium*, *M. hominis* y *U. urealyticum* en los pacientes positivos al VIH y en los pacientes negativos a este virus (Keane et al., 2000; Manhas et al., 2009).

En pacientes con síntomas urogenitales se describen aislamientos de otras especies de micoplasmas, como *M. penetrans* en muestras uretrales de hombres con UNG aguda, al igual que *M. fermentans*, *M. spermatophilum* e incluso *M. pneumoniae* (Waites y Talkington, 2004; Waites y Taylor-Robinson, 2007). Estas especies pueden estar incluidas en el porcentaje (44,5%) de las muestras positivas a la clase *Mollicutes* que no son identificadas en nuestro estudio.

*M. hominis*, *M. genitalium*, *U. urealyticum* y *U. parvum* son estudiadas por Gdoura et al., quienes utilizan un método molecular basado en una PCR de hibridación en micro placa y refieren la rapidez y sencillez del método para la identificación de estas especies y la realización de estudios epidemiológicos (Gdoura et al., 2007).

#### **4.5 Consideraciones generales**

En el presente trabajo se expresan los resultados del diagnóstico de especies de micoplasmas y ureaplasmas reportadas por primera vez en pacientes cubanos con síntomas respiratorios y urogenitales, así como también en mujeres infértiles.

El diagnóstico microbiológico que se realiza a través de métodos moleculares, como la amplificación del ADN por la PCR y sus variantes, demuestra ser una herramienta de avanzada por su alta sensibilidad, especificidad y rapidez, sobre todo en la detección de patógenos extremadamente exigentes en su viabilidad y multiplicación in vitro, como son

las especies de la clase *Mollicutes*, que por su pequeño tamaño requieren de nutrientes esenciales para su multiplicación, como también por carecer de pared celular son extremadamente sensibles, principalmente a los cambios osmóticos y pH; lo que influye marcadamente en los resultados del laboratorio, sobre todo si estos se obtienen por métodos tradicionales, como el cultivo bacteriológico seguido de pruebas bioquímicas y serológicas; las que son laboriosas, requieren de tiempo, así como de personal especializado.

En el LNRIM-IPK, a partir del año 1994 se desarrolla el diagnóstico microbiológico para la detección de micoplasmas y ureaplasmas en muestras clínicas de pacientes con síntomas respiratorios y urogenitales, y más tarde en muestras clínicas de mujeres y hombres infértiles. El diagnóstico, en un inicio, se realizaba sólo por los métodos tradicionales del cultivo bacteriológico en medios líquido y sólido, seguido de pruebas bioquímicas para la identificación de *M. hominis* y *U. urealyticum* en muestras del tracto urogenital y de *M. pneumoniae* en muestras del tracto respiratorio. Sin embargo, era necesario ampliar el diagnóstico hacia otras especies también asociadas a enfermedades en el hombre; por lo que se desarrollan variantes del método de la PCR para diagnosticar un mayor número de especies pertenecientes a la clase *Mollicutes* en individuos cubanos.

En un primer estudio se desarrolla una variante molecular basada en una PCR-Simple seguida de una PCR-Anidada, previamente se utilizan cepas de referencia para validar estas variantes de PCR, con la que se obtienen resultados satisfactorios. La aplicación de estas variantes de PCR se realiza en muestras clínicas de pacientes con síntomas respiratorios positivos y negativos al VIH. A las muestras clínicas se les realizan un “cultivo primario” en medio selectivo para micoplasmas, lo que facilita el crecimiento inicial de estos

microorganismos, además de diluir inhibidores y atenuar posibles biológicos presentes en las muestras clínicas, los que pueden interferir en el diagnóstico.

A partir de estos cultivos primarios, se obtienen muestras de ADN mediante un método sencillo basado en choque osmótico y térmico, con resultados favorables, proporcionado por la carencia de pared celular de estas bacterias. Posteriormente, estas muestras de ADN se analizan por una variante de PCR-Simple desarrollada para la detección de las muestras positivas a la clase *Mollicutes*, y mediante una PCR-Anidada se identifican las muestras positivas a *M. pneumoniae*, además a *M. hominis*, *M. fermentans* y *U. urealyticum*, estas tres últimas especies reportadas por primera vez en pacientes cubanos con síntomas respiratorios positivos al VIH. Un grupo de muestras clínicas positivas a la clase *Mollicutes* quedan sin identificar, las que pueden ser *M. penetrans* o *M. pirum*, ambas reportadas como especies frecuentes en pacientes positivos al VIH, no incluidas en esta investigación.

En un segundo estudio se desarrolla una PCR-Múltiple para identificar *U. parvum* y *U. urealyticum*, donde se valida en cepas de referencia con resultados satisfactorios. Este PCR-Múltiple se aplica combinadamente con la utilización del estuche comercial MFE-2 para se identificar *M. hominis* en muestras clínicas de mujeres infértiles y fértiles. Como resultados se conoce que *U. parvum* aparece con mayor frecuencia en mujeres infértiles seguido de *U. urealyticum*, mientras que *M. hominis* la frecuencia mayor se identifica en mujeres fértiles. El uso combinado de la PCR-Múltiple y el estuche comercial MFE-2 permiten el diagnóstico de infecciones por estas especies de mollicutes, logrando identificar por primera vez en mujeres pacientes cubanas las especies de ureaplasmas por la nueva clasificación taxonómica.

En el tercer estudio se desarrolla el diagnóstico para *M. genitalium* por una PCR-Simple estudiando dos juegos de cebadores. Mediante la PCR-Simple con el juego de cebadores complementarios al gen de la proteína adhesiva se obtiene un mayor número de muestras positivas a *M. genitalium* que cuando se utiliza la PCR-Simple con el juego de cebadores complementarios al gen del ARN 16S; por lo que el diagnóstico de esta especie de micoplasma debe ser dirigido a amplificar un fragmento del gen de la proteína de adhesión.

Por último, se desarrolla una variante de PCR-Múltiple para identificar *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. parvum* y *U. urealyticum*, el que es validada en muestras de ADN de cepas de referencia con resultados satisfactorios. Esta PCR-Múltiple se aplica para el estudio de muestras clínicas de hombres y mujeres con síntomas urogenitales. En las muestras clínicas de mujeres *U. parvum* es la de mayor frecuencia, mientras en las de los hombres la mayor frecuencia es de *M. hominis*, seguido de *M. genitalium*. En ambos grupos de estudios de mujeres y hombres con síntomas urogenitales quedan muestras positivas a la clase *Mollicutes* en las que no se identifican las especies, éstas pueden ser *M. fermentans*, *M. amphoriforme*, *M. pirum* o *M. spermatophilum*, reportadas en pacientes con síntomas urogenitales, no incluidas en esta investigación para su estudio.

## **V. CONCLUSIONES**

## V. CONCLUSIONES

- Las variantes de la PCR-Simple para clase *Mollicutes* y la PCR-Anidada para *M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. fermentans* y *U. urealyticum* permiten la identificación de estas especies en muestras clínicas de pacientes con manifestaciones respiratorias, lo que proporciona un diagnóstico específico para el tratamiento de estas afecciones.
- *M. hominis*, *M. fermentans* y *U. urealyticum* se identifican con mayor frecuencia en pacientes positivos al VIH con síntomas respiratorios, lo que sugiere una posible relación de estos microorganismos como oportunista en pacientes inmunodeprimidos.
- Mediante el método de la PCR-Múltiple para *U. parvum* y *U. urealyticum* se identifican las especies de ureaplasmas presentes en muestras clínicas, constituyendo una herramienta eficaz para estudios epidemiológicos.
- En mujeres infértiles *U. parvum* y *U. urealyticum* se detectan con mayor frecuencia y en mujeres fértiles *M. hominis*, lo que permite dirigir una conducta terapéutica a seguir en estas mujeres.
- La PCR-Simple para el gen de proteína de adhesión de *M. genitalium*, presenta mayor sensibilidad en muestras clínicas, lo que sugiere sea la molécula diana para el diagnóstico de infecciones por este agente etiológico.
- La PCR-Múltiple para *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. parvum* y *U. urealyticum* permite la identificación de estas especies en pacientes con infecciones urogenitales, lo que contribuye al estudio de estas entidades clínicas.
- En pacientes con síntomas urogenitales *U. parvum* constituye la especie con mayor frecuencia en mujeres, y *M. hominis* y *M. genitalium* en hombres.
- En los diferentes grupos de estudios se detectan muestras positivas a la clase *Mollicutes*, en las que no se identifican las especies, resultado que sugiere la presencia de otros micoplasmas no incluidos en esta investigación.

## **VI. RECOMENDACIONES**

## VI. RECOMENDACIONES

- Continuar aplicando en el Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de Micoplasmas las nuevas variantes de las PCR desarrolladas en esta tesis para el diagnóstico de infecciones por micoplasmas y ureaplasmas.
- Realizar estudios de validaciones de las variantes de las PCR desarrolladas a partir de la muestras clínicas directas.
- Implementar en el Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de Micoplasmas el diagnóstico de las especies *M. penetrans*, *M. amphoriforme*, *M. pirum* y *M. spermatophilum*.
- Desarrollar estudios epidemiológicos dirigidos a conocer la asociación de especies de micoplasmas y ureaplasmas con diferentes enfermedades en pacientes cubanos.
- Divulgar a nivel nacional los resultados encontrados en esta investigación.

## **VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abelé-Horn M, Wolff C, Dressel P, Pfaff F, Zimmermann A. Association of *Ureaplasma urealyticum* biovars with clinical outcome for neonates, obstetric patients, and gynecological patients with pelvic inflammatory disease. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1199-1202.
- Ainsworth JG, Clarke J, Lipman M, Mitchell D, Taylor-Robinson D. Detection of *Mycoplasma fermentans* in broncho-alveolar lavage fluid specimens from AIDS patients with lower respiratory tract infection. *HIV Med.* 2000;(4):219-23.
- Almanza C. Micoplasmas y Ureaplasmas. En: *Microbiología y Parasitología Médica*. Tomo 1. La Habana, Cuba: ed. Ciencias Médicas; 2001. p. 82-86.
- Altwegg M. General problems associated with diagnostic applications of amplification. *Microbiol Methos.* 1995;23:21-30.
- Amirmozafari N, Mirnejad R, Kazemi B, Sariri E, Bojari MR, Darkahi FD. Comparison of polymerase chain reaction and culture for detection of genital mycoplasma in clinical samples from patients with genital infections. *Saudi Med J.* 2009;30(11):1401-5.
- Amores J, Corrales JC, Martín AG, Sánchez A, Contreras A, de la Fe C. Comparison of culture and PCR to detect *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. capri in ear swabs taken from goats. *Vet Microbiol.* 2010;140(1-2):105-08.
- Anagnrius CB, Loré D, Jensen JS. *Mycoplasma genitalium*: prevalence, clinical significance, and transmission. *Sex. Transm. Inf.* 2008;81:458-62.
- Arya OP, Tong CY, Hart CA, Pratt BC, Hughes S, Roberts P, Kirby P, Howel J, McCormick A, Goddard AD. Is *Mycoplasma hominis* a vaginal pathogen? *Sex. Transm. Infect.* 2001;77:58-62.

- Bacich DJ, Sobek KM, Cummings JL, Atwood AA, O'Keefe DS. False negative results from using common PCR reagents. *BMC Research Notes*. 2011;4:457.
- Baier RJ, Loggins J, Kruger TE. Failure of erythromycin to eliminate airway colonization with *Ureaplasma urealyticum* in very low birth weight infants. *BCM Pediatrics*. 2003;3(10).
- Barbeyrac B, Bebear C, Taylor-Robinson D. PCR: Preparation of DNA from clinical specimens. En: Tully JG, Razin S, editores. *Molecular and diagnostic procedures in Mycoplasma*. Vol. II. New York: Academic Press Inc; 1996. p. 61-74.
- Barile MF. Arginine hydrolysis. En: Razin S, Tully JG, editores. *Methods in Mycoplasma*. Vol. 1. New York: Academic Press Inc; 1983. p. 345-48.
- Barykova IA, Logunov DY, Shmarov MM, Vinarov AZ, Fiev DN, Vinarova NA, et al., Association of *Mycoplasma hominis* infection with prostate cancer. *Oncotarget*. 2011;4:102-06.
- Barykova IA, Shmarov MM, Logunov Dlu, Verkhovskaia LV, Aliaev IuG, Fiev DN, et al. Identification of *Mycoplasma* in patients with suspected prostate cancer *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 2010;(4):81-5.
- Baseman JB, Cagle M, Korte JE, Herrera C, Rasmussen WG, Baseman JG, Shain R, Piper J. Diagnostic assessment of *Mycoplasma genitalium* in culture-positive women. *J. Clin. Microbiol*. 2004;42:203-11.
- Baseman JB, Lange M, Criscimagna NL, Giron JA, Thomas CA. Interplay between mycoplasmas and host target cells. *Microb Pathog*. 1995;19:105-16.
- Blaylock MW, Musatovova O, Baseman JG, Baseman JB. Determination of Infectious Load of *Mycoplasma genitalium* in Clinical Samples of Human Vaginal Cells. *J Clin Microbiol*. 2004;42(2):746-52.
- Bolske G. Survey of mycoplasma infections in cell cultures and comparison of

- detection methods. Zbl Bakteriologie Microbiologie Hygiene A2. 1988;(69):331-40.
- Borovkova N, Korrovits P, Ausmees K, Türk S, Jöers K, Punab M, Mändar R. Influence of sexual intercourse on genital tract microbiota in infertile couples Borovkova. Anaerobe. 2011;29:223-25.
  - Borovsky Z, Tarshis M, Zhang P, Rottem S. *Mycoplasma penetrans* invasion of HeLa cells induces protein kinase C activation and vacuolation in the host cells. J Med Microbiol. 1998;47:915-22.
  - Bradshaw CS, Jensen JS, Tabrizi SN, Read TRH, Garland SM, Hopkins CA, Moss LM, Fairley CK. Azithromycin failure in *Mycoplasma genitalium* urethritis. Emerg. Infect. Diseases. 2006;12(7):1149-52.
  - Brock T, Madigan M. Mycoplasma. En: Brock T, Madigan M, editores. Biology of Microorganisms. 6<sup>ta</sup> edición, Prentice-Hall International Inc. 2001; p. 779-82.
  - Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Micoplasmas y bacterias con pared celular defectuosa. En: Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA, editores. Microbiología Médica. Edición 16. México, DF: Manual Modern; 2007. p. 369-73.
  - Brown DR, Whitcomb RF, Bradbury JM. Revised minimal standards for description of new species of the class *Mollicutes* (division Tenericutes). Int J Syst Evol Microbiol. 2007;57(Pt 11):2703-19.
  - Brown DR. Phylum XVI. Tenericutes. En: De Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman WB, editores. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2<sup>da</sup> edición vol. 3. New York: Springer; 2010. p. 253-404.
  - Cao X, Wang Y, Hu X, Qing H, Wang H. Real-time TaqMan polymerase chain reaction assays for quantitative detection of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007;57:373-78.
  - Carey JC, Blackwelder WC, Nugent RP, Matteson MA, Rao AV, Eschenbach DA,

- Lee ML, Rettig PJ, Regan JA, Geromanos KL, *et al.* Antepartum cultures for *Ureaplasma urealyticum* are not useful in predicting pregnancy outcome. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1991;164:728-33.
- Cassell GH, Waites KB, Crouse DT. Mycoplasmal infections. En: Remington JS, Klein JO, editores. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant.* Philadelphia: 5th ed. W.B. Saunders Co. Inc.; 2001. p. 733-67.
  - Cedillo-Ramirez L, Gil C, Zago I, Yanez A, Giono S. Association of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* with some Indicators of Nonspecific Vaginitis. *Rev. Latinoamer. Microbio.* 2000;42:1-6.
  - Cervantes E. Micoplasmas patógenos para el humano. *Rev Fac Med UNAM.* 2009;52(6):253-59.
  - Chávez Y, Fernández C, Johansson K-E. PCR en el diagnóstico veterinario de micoplasmas. *Biotechnología Aplicada.* 1996;13:1:35.
  - Cheong KA, Agrawal SR, Lee AY. Validation of nested PCR and a selective biochemical method as alternatives for mycoplasma detection. *J Basic Microbiol.* 2011 Apr;51(2):215-19.
  - CITMA. Resolución No. 38/2006: Lista oficial de agentes biológicos que afectan al hombre, los animales y las plantas; 2006.
  - Colaizy TT, Kuforiji T, Sklar RS, Pillers AM. PCR methods in clinical investigations of human ureaplasmas: a minireview. *Mol. Genet. Metab.* 2003;80:389-97.
  - Couldwell DL, Gidding HF, Freedman EV, McKechnie ML, Biggs K, Sintchenko V, Gilbert GL. *Ureaplasma urealyticum* is significantly associated with non-gonococcal urethritis in heterosexual Sydney men. *Int J STD AIDS.* 2010;21(5):337-41.
  - Cultrera R, Roulland-Dussoix D, Romani R, Contini C. Use of PCR to detect

mycoplasma DNA in respiratory tract specimens from adult HIV-positive patients. J Med Microbiol. 1998;47(11):983-86.

- Dallo SF, Baseman JB. Intracellular DNA replication and long-term survival of pathogenic mycoplasmas. Microb Pathog. 2000;29:301-09.
- Daxboeck F, Krause R, Wenisch C. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. Clin Microbiol Infect. 2003;9:263-73.
- Daxboeck F, Zitta S, Stadler M, Iro E, Krause R. *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in patients with sterile pyuria. J Infect. 2005;51:54-58.
- De Francesco MA, Negrini R, Pni G, Peroni L. Detection of *Ureaplasma biovars* and polymerase chain reaction-based subtyping of *Ureaplasma parvum* in women with or without symptoms of genital infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009;28:641-46.
- De Silva NS, Quinn PA. Localization of endogenous activity of phospholipases A and C in *Ureaplasma urealyticum*. J. Clin. Microbiol. 1991;29:1498-1503.
- De Silva NS, Quinn PA. Characterization of phospholipase A1, A2, C activity in *Ureaplasma urealyticum* membranes. Mol. Cell. Biochem. 1999;201:159-67.
- Debattista J, Gazzard CM, Wood RN, Allan JA, Allan JM, Scarman A, et al. Interaction of microbiology and pathology in women undergoing investigations for infertility. Infect Dis Obstet Gynecol. 2004;12:135-45.
- Deguchi T, Yoshida T, Miyazawa T, Yasuda M, Tamaki M, Ishiko H, et al. Association of *Ureaplasma urealyticum* (Biovar 2) with Nongonococcal Urethritis. Sex Trans Dis. 2004;31(3):192-95.
- Deng S, Hiruki C, Robertson JA, Stemke GM. Detection by PCR and differentiation by restriction fragment length polymorphism of *Acholeplasma*, *Spiroplasma*, *Mycoplasma* and *Ureaplasma*, based upon 16S rRNA genes. PCR Methods and

applications. 1992;1:202-04.

- Denks K, Spaeth EL, Joers K, Randoja R, Talpsep T, Ustav M, Kurg R. Coinfection of *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* and human papillomavirus among patients attending STD clinics in Estonia. Scand J Infect Dis. 2007;39:714-18.
- Dessì D, Delogu G, Emonte E, Catania MR, Fiori PL, Rappelli P. Long-term survival and intracellular replication of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* cell: potential role of the protozoon in transmitting bacterial infection. Infect. Immun. 2005;73(2):1180-86.
- Deutschmann SM, Kavermann H, Knack Y. Validation of a NAT-based Mycoplasma assay according European Pharmacopoeia. Biologicals. 2010;38:234-38.
- Diaz N, Dessì D, Dessole S, Fiori PL, Rappelli P. Rapid detection of coinfections by *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, and *Ureaplasma urealyticum* by a new multiplex polymerase chain reaction. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010;67:30-36.
- Donders GG, Van Bulck B, Caudron J, Londers L, Vereecken A, Spitz B. Relationship of bacterial vaginosis and micoplasmas to the risk of spontaneous abortion. Am J Obstet Gynecol. 2000;183(2):431-37.
- Edberg A, Jurstrand M, Johansson E, Wikander E, Hoog A, Ahlqvist T, et al. A comparative study of three different PCR assays for detection of *Mycoplasma genitalium* in genital specimens from men and women. J Med Microbiol. 2008;57:304-09.
- Edward DG, Freundt EA. Proposal for *Mollicutes* as name of the class established for the order *Mycoplasmatales*. Int. J. Syst. Bacteriol. 1967;17:267-68.
- Elias M, Goluda M, Kuryllo M, Maczynska B, Stankiewicz M, Kmiecik K, Jedryka M. *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* of cervical canal and in the pouch of Douglas in infertile women: a preliminary report. Ginekol Pol. 1998;69(12):1150-52.

- Espy MJ, Uh JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JDC, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill III FR, Smith TF. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006;19(1):165–256.
- Fadiel A, Eichenbaum KD, El Semary N, Epperson B. *Mycoplasma* genomics: tailoring the genome for minimal life requirements through reductive evolution. *Front Biosci.* 2007;12:2020-28
- Fedoseev A, Durruty C, Más Lago P. Aislamiento de los micoplasmas a partir de los cultivos de tejidos. *Rev. Cuba. Hig. Epidemiol.* 1974;12(1):77-84.
- Fenkei V, Yilmazer M, Aktepe OC. Have *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infections any significant effect on women fertility? *Infez Med.* 2002;10(4):220-23.
- Férandon C, Peuchant O, Janis C, Benard A, Renaudin H, Pereyre S, Bébéar C. Development of a real-time PCR targeting the *yidC* gene for the detection of *Mycoplasma hominis* and comparison with quantitative culture. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(2):155-59.
- Fletcher RD, GilbertsonI JR, Albers AC, White JD. Inactivation of Mycoplasmas by Long-Chain Alcohols. *Antimicrob Agent Chemoth.* 1981;19(5):917-21.
- Furneri PM, Rappazzo G, Musumarra MP, Tempera G, Roccasalva LS. Genetic basis of natural resistance to erythromycin in *Mycoplasma hominis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2000;45:547-48.
- Garnier JM, Noel G, Retornaz K, Blanc P, Minodier P. Extrapulmonary infections due to *Mycoplasma pneumoniae*. *Arch Pediatr.* 2005;12(Suppl 1):S2-6.
- Garrity GM, Lilburn TG, Cole JR, Harrison SH, Euzéby J, Tindall BJ. The Bacteria: Phylum Firmicutes, Class Mollicutes. The Taxonomic outline of the Bacteria and Archaea. 2007;8:317-32. Disponible en: <http://www.taxonomicoutline.org/>.

- Gaydos C, Maldeis NE, Hardick A, Hardick J, Quinn TC. *Mycoplasma genitalium* as a contributor to the multiple etiologies of cervicitis in women attending sexually transmitted disease clinics. *Trans Dis.* 2009;21:122-27.
- Gdoura R, Kchaou W, Chaari C, Znazen A, Keskes L, Rebai T, Hammami A. *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* infections and semen quality of infertile men. *BMC Infect. Dis.* 2007;7:129.
- Geißdorfer W, Sandner G, John S, Gessner A, Schoerner C, Schoppel K. *Ureaplasma urealyticum* meningitis in an adult patient. *J. Clin. Microbiol.* 2008;46(3):1141-43.
- Girón JA, Lange M, Baseman JB. Adherence, fibronectin binding, and induction of cytoskeleton reorganization in cultured human cells by *Mycoplasma penetrans*. *Infect Immun.* 1996;64:197-208.
- Glass JI, Assad-Garcia N, Alperovich N, Yooseph S, Lewis MR, Maruf M, et al. Essential genes of a minimal bacterium. *PNAS* 2006;103(2):425–30.
- Goldenberg RL, Andrews WW, Goepfert AR, Faye-Petersen O, Cliver SP, Carlo WA, Hauth JC. The Alabama Preterm Birth Study: Umbilical Cord Blood *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* Cultures in Very Preterm Newborns. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;198(1):43.e1-43.e5.
- Grau O, Kovacic R, Griffais R, Montagnier L. Development of a selective and sensitive polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycoplasma pirum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1993;106:327-33.
- Gubelin W, Martinez MA, Cespedes P, Fich F, Fuenzalida H, De la Parra R, et al. Aplicación de método molecular en la detección de *M. genitalium* en hombres y en mujeres embarazadas. *Rev Chil Infect* 2006; 23(1):15-19.
- Günyeli I, Abike F, Dünder I, Aslan C, Tapısız OL, Temizkan O, Payaslı A, Erdemoğlu E. Chlamydia, Mycoplasma and Ureaplasma infections in infertile

couples and effects of these infections on fertility. Arch Gynecol Obstet. 2011;283(2):379-85.

- Gupta V, Dhawan B, Khanna N, Agarwal N, Bhattacharya SN, Sreenivas V, Chaudhry R. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008;60:95-97.
- Haggerty CL, Totten PA, Astete SG, Lee S, Hoferka SL, Kelsey SF, Ness RB. Failure of cefoxitin and doxycycline to eradicate endometrial *Mycoplasma genitalium* and the consequence for clinical cure of pelvic inflammatory disease. Sex Trans Infect. 2008;84:338-42.
- Hardick J, Giles J. Performance of the Gen – Probe Transmission - Mediated Amplification Research Assay Compared to That of a Multitarget Real- Time PCR for *Mycoplasma genitalium* Detection. J Clin Microbiol. 2006;44(4):1236-40.
- Harwick HJ, Kalmanson GM, Guze LB. Human diseases associated with mycoplasmas-With an appendix on simple culture techniques. Calif Med. 1972;116:1-7.
- Hashimoto O, Yoshida T, Ishiko H. Quantitative detection and phylogeny-based identification of mycoplasmas and ureaplasmas from human immunodeficiency virus type 1-positive patients. J Infect Chemother. 2006;12:25-30.
- Hayflick L, Chanock RM. Mycoplasmas species of man. Bacteriol. Reviews. 1965;29(2):186-212.
- Hilliard, NJ, Duffy LB, Crabb DM, Waites KB. *In vitro* comparison of agar and microbroth dilution methods for determination of MICs for *Mycoplasma hominis*. J. Microbiol. Meth. 2005;60:285-88.
- Hillier S, Holmes KK. Bacterial vaginosis. En: Holmes KK, Mardh PA, Sparling PF, Wiesner W, Cases S, Lemon SM, Stamm WE, Piot P, Wasserheit JN, editores. Sexually transmitted diseases. New York: 3<sup>ra</sup> edición. McGraw Hill; 1999. p. 563-86.

- Imudia AN, Detti L, Puscheck EE, Yelian FD, Diamond MP. The prevalence of *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections, and the rubella status of patients undergoing an initial infertility evaluation. *J Assist Reprod Genet.* 2008;25:43-46.
- Jensen JS. *Mycoplasma genitalium*: an etiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases. *J Eur Acad Dermatol Venerol.* 2004;18:1-11.
- Jensen JS. *Mycoplasma genitalium* infections. Diagnosis, clinical aspects, and pathogenesis. *Dan Med Bull* 2006;53:1-27.
- Jensen JS, Bjornelius E, Dohn B, Lidbrink P. Use of TaqMan 5' nuclease real-time PCR for quantitative detection of *Mycoplasma genitalium* DNA in males with and without urethritis who were attendees at a sexually transmitted disease clinic. *J Clin Microbiol.* 2004;42:683-692.
- Jensen JS, Borre MB, Dohn B. Detection of *Mycoplasma genitalium* by PCR Amplification of the 16S rRNA Gene. *J Clin Microbiol.* 2003;261-66.
- Jensen JS, Hansen HT, Lind K. Isolation of *Mycoplasma genitalium* strains from the male urethra. *J. Clin. Microbiol.* 1996;34:286-91.
- Jian-Ru W, Bei W, Hao C, Jin-Shui X, Xi-Ping H. Mycoplasmas in the urine of HIV-1 infected men. *Epidemiol Infect.* 2011;27:1-6.
- Johansson KE. Oligonucleotide probes complementary to 16S rRNA. En: Tully JG, Razin S, editores. *Molecular and Diagnostic Procedure in Mycoplasmaology Vol.II.* New York: Academic Press INC; 1995. p. 29-46.
- Kataoka S, Yamada T, Chou K, Nishida R, Morikawa M, Minami M, Yamada H, Sakuragi N, Minakami H. Association between preterm birth and vaginal colonization by micoplasmas in early pregnancy. *J. Clin. Microbiol.* 2006;44(1):51-55.

- Keane FE, Thomas B, Renton A. Investigation into possible role of bacterial vaginosis in non gonococcal urethritis. *Genitourin Med.* 1997;73:373-77.
- Keane FE, Thomas BJ, Gilroy CB, Renton A, Taylor-tobinson D. The association of *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma genitalium* with non-gonococcal urethritis: observations on heterosexual men and their female partners. *Int J STD AIDS.* 2000;11:435-39.
- Kim SJ, Lee DS, Lee SJ. The Prevalence and Clinical Significance of Urethritis and Cervicitis in Asymptomatic People by Use of Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Korean J Urol.* 2011; 52(10):703-08.
- Kim TH, Kim HR, Myung SC. Detection of nanobacteria in patients with chronic prostatitis and vaginitis by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Korean J Urol.* 2011;52:194–99.
- Knox CL, Timms P. Comparison of PCR, Nested PCR, and Random Amplified Polymorphic DNA PCR for Detection and Typing of *Ureaplasma urealyticum* in Specimens from Pregnant Women. *J. Clin. Microbiol.* 1998;36(10):3032-39.
- Kong F, James G, Ma Z, Gordon S, Wang B, Gilbert GL. Phylogenetic analysis of *Ureaplasma urealyticum* - support for the establishment of a new species, *Ureaplasma parvum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999;49:1879-89.
- Kong F, Ma Z, James G, Gordon S, Gilbert G. Species Identification and Subtyping of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* Using PCR-Based Assays. *J Cli Microbiol.* 2000;38( 3):1175-79.
- Krause DC, Taylor-Robinson D. Mycoplasmas with infects humans. En: Maniloff J, McElhaney RN, Finch LR, Baseman JB, editores. *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis.* Washington DC: Editorial American Society for Microbiology; 1992. p. 417-44.

- Lee SR, Chung JM, Kim YG. Rapid one step detection of pathogenic bacteria in urine with sexually transmitted disease (STD) and prostatitis patient by multiplex PCR assay (mPCR). *J. Microbiol.* 2007;45(5):453-59.
- Lo SC. Mycoplasmas and AIDS. En: Maniloff J, McElhaney RN, Finch LR, Baseman JB, editores. *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis.* Washington DC: Editorial American Society for Microbiology; 1992. p. 525-45.
- Louie M, Louie L, Simor AE. The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. *CMAJ.* 2000;163(3):301-09.
- Mallard K, Schopfer K, Bodmer T. Development of real-time PCR for the differential detection and quantification of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum*. *J. Microbiol. Methods.* 2005;60:13-19.
- Manhart LE, Kay N. *Mycoplasma genitalium*: Is It a Sexually Transmitted Pathogen? *Curr Infect Dis Rep.* 2010 Jul;12(4):306-13.
- Manhas A, Sethi S, Sharmen M, Wanchu A, Kanwar AJ, Kaur K, et al. Association of micoplasmas genital including *M. genitalium* in HIV infected men with nongocccocal urethritis attending STD & HIV clinics. *India J Med Res.* 2009;129:305-10.
- Maniloff J. Phylogeny and evolution. En: Razin S, Herrmann R, editores. *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas.* New York: Kluwer. Academic/Plenum Publishers; 2002. p. 31–43.
- Marmion BP, Goodburn GM. Effect of organic gold salt on Eaton's primary atypical pneumonia agent and other observations. *Nature.* 1961;189:247-48.
- Martínez A, Fernández C. Detección e Identificación de Micoplasmas en Cultivos de Células. *Rev. Salud Animal.* 1996;18:1:1-4.
- Martínez MA, Ruiz M, Zunino E, Luchsinger V, Avendaño LF. Detection of

*Mycoplasma pneumoniae* in adult community-acquired pneumonia by PCR and serology. J Med Microbiol. 2008;57(Pt 12):1491-95.

- McAuliffe L, Ellis RJ, Ayling RD, Nicholas RA. Differentiation of *Mycoplasma* species by 16S ribosomal DNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting. J. Clin. Microbiol. 2003;41:4844-47.
- McGarrity G J, Kotani H, Butler GH. Mycoplasmas and tissue culture cells. En: Maniloff J, McElhaney RN, Finch LR, Baseman JB, editores. Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis. Washington DC: Editorial American Society for Microbiology; 1992. p.445-54.
- McGowin CL, Popov VL, Pyles RB. Intracellular *Mycoplasma genitalium* infection of human vaginal and cervical epithelial cells elicits distinct patterns of inflammatory cytokine secretion and provides a possible survival niche against macrophage-mediated killing. BMC Microbiology. 2009;9:139.
- McIver CJ, Rismanto N, Smith C, Naing ZW, Rayner B, Lusk JM, Konecny P, et al. Multiplex PCR Testing Detection of Higher-than-Expected Rates of Cervical Mycoplasma, Ureaplasma, and Trichomonas and Viral Agent Infections in Sexually Active Australian Women. J Clin Microbiol. 2009;47(5):1358-63.
- Miles RJ, Taylor RR, Abu-Groun EAM, Alimaohammadi A. Diversity of energy-yielding metabolism in *Mycoplasma* spp. IOM Lett. 1994;3:165-66.
- Montagnier L, Blanchard A. Mycoplasmas as cofactors in infection due to the human immunodeficiency virus. Clin. Infect. Dis. 1993;17(Suppl. 1):S309-S315.
- Nadagir SD, Kaleem B, Anantappa ST. Prevalence of *Mycoplasma pneumoniae* among HIV infected children. Indian J Pediatr. 2010. PMID:21161445 [PubMed – as supplied by publisher]
- Nadal D, Bossart W, Zucol F, Steiner F, Berger C, Lips, U, Altwegg. Community-acquired pneumonia in children due to *Mycoplasma pneumoniae*: Diagnostic

- performance of a seminested 16S rDNA-PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2001;39:15-19.
- Namiki K, Goodison S, Porvasnik S, Allan RW3, IczkowskiKA, Urbanek C, et al. Persistent Exposure to *Mycoplasma* Induces Malignant Transformation of Human Prostate Cells. *PLoS ONE.* 2009;4:1-9.
  - Nilsson A, Bjorkman P, Persson K. Polymerase chain reaction is superior to serology for the diagnosis of acute *Mycoplasma pneumonia* infection and reveals a high rate of persistent infection. *BCM Microbiol.* 2008;8:93.
  - Palu G, Valisena S, Barile MF, Meloni GA. Mechanisms of macrolide resistance in *Ureaplasma urealyticum*: a study on collection and clinical strains. *Eur. J. Epidemiol.* 1989;5:146-53.
  - Pascual A, Perez M-H, Jatón K, Hafén G, Di Bernardo S, Cotting J, et al. *Mycoplasma hominis* necrotizing pleuropneumonia in a previously healthy adolescent. *BMC Infect Dis.* 2010;10:335.
  - Pérez MF, Almanza C. *Micoplasma* y *Ureaplasma*. En: Llop A, Valdés-Dapena MM, Zuazo JL, editores. *Microbiología y Parasitología Médicas*. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2001. p. 419-26.
  - Pitcher D, Sillis M, Robertson JA. Simple method for determining biovar and serovar types of *Ureaplasma urealyticum* clinical isolates using PCR-single-strand conformation polymorphism analysis. *J Clin Microbiol.* 2001;39:1840-44.
  - Pollack JD, Williams MV, Banzon J, Jones MA, Harvey L, Tully JG. Comparative metabolism of *Mesoplasma*, *Entomoplasma*, *Mycoplasma*, and *Acholeplasma*. *Int J Syst Bacteriol.* 1996;46:885-90.
  - Razin S. *Mycoplasmas*: the smallest pathogenic procaryotes. *Isr J Med Sci.* 1981;17:510.

- Razin S. Identification of *Mycoplasma* colonies. En: Razin S, Tully JG, editores. Methods in Mycoplasmology Vol I. New York: Academic Press Inc; 1983<sub>a</sub>. p. 83-88.
- Razin S. Urea hydrolysis. En: Razin S, Tully JG, editores. Methods in Mycoplasmology. Vol I. New York: Academic Press Inc; 1983<sub>b</sub>. p. 351-53.
- Razin S. Molecular biology and genetics of Mycoplasmas (*Mollicutes*). Microbiol Rev. 1985;49(4):419-55.
- Razin S, Cirillo VP. Sugar fermentation. En: Razin S, Tully JG, editores. Methods in Mycoplasmology. Vol I. New York: Academic Press Inc; 1983. p. 337-43.
- Razin S, Hayflick L. Highlights of mycoplasma research-An historical perspective. Biologicals. 2010;38:183-90.
- Razin S, Jacobs E. Mycoplasma adhesion. J Gen Microbiol. 1992;138:407-22.
- Razin S, Tully JG. Cholesterol requirement of mycoplasmas. J Bacteriol. 1970;102:306-10.
- Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Microbiol Rev. 1998;63:1094-56.
- Ríos AM, Fonseca-Aten M, Mejías A, Chávez-Bueno S, Katz K, Gómez AM, McCracken GH, Ramilo O, Hardy RD. Microbiologic and immunologic evaluation of a single high dose of azitromycin for treatment of experimental *Mycoplasma pneumoniae*. Antimic. Agent. Chemother. 2005;49(9):3970-73.
- Robertson JA, Gomersall M, Gill P. *Mycoplasma hominis*: growth, reproductions, and isolations of small viable cells. J Bacteriol. 1975;124(2):1007-18.
- Robertson JA. Effect of Gaseous Conditions on Isolation and Growth of *Ureaplasma urealyticum* on Agar. J Clin Microbiol. 1982;15(2):200-03.
- Rocha E, Blanchard A. Genomic repeats, genome plasticity and the dynamics of

- Mycoplasma evolution. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(9):2031-42.
- Roche. PCR Applications Manual. 3<sup>era</sup> edición; 2005. p. 19-21.
  - Rottem S. Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiol. Rev.* 2003;83:417-32.
  - Saiki RK, Scharf S, Faluona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic Amplification of beta globin genomic sequence and restriction sited analysis for diagnosis of sickle cell. *Science.* 1985;230:1350-54.
  - Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. In vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction. En *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 1989. 1414.
  - Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Gel Electrophoresis of DNA and Pulsed-Field Agarose. En: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 2000. 444.
  - Schlicht MJ, Lovrich SD, Sartin JS, Karpinsky P, Callister SM, Agger WA. High prevalence of genital micoplasmas among sexually active young adults with urethritis or cervicitis symptoms in La Crosse, Wisconsin. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42(10):4636-40.
  - Shahhosseiny MH, Hosseiny Z, Khoramkhorshid HR, Azari S, Shokrgozar MAJ. Rapid and sensitive detection of Mollicutes in cell culture by polymerase chain reaction *Basic Microbiol.* 2010;50(2):171-78.
  - Shankar EM, Rajasekaran S, Rao UA, Paramesh P, Krishnakumar R, Rajan R, Kownhar H. Colonization of mycoplasma in the upper respiratoty tract of AIDS patients with pulmonary symptoms in Chennai, India. *Indian J Med.* 2005;122:506-10.
  - She RC, Thurber A, Hymas WC, Stevenson J, Langer J, Litwin CM, Petti CA. Limited Utility of Culture for *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae*

- for the Diagnosis of Respiratory Tract Infections. J Clin Microbiol. 2010;7:12.
- Shepard MC, Lunceford C. Differential Agar Medium (A7) for identification of *Ureaplasma urealyticum* (Human T Mycoplasmas) in Primary Cultures of Clinical Material. J Clin Microbiol. 1976;3(6):613-25.
  - Shepard MC. Culture media for ureaplasmas. En: Razin S, Tully JG, editores. Methods in Mycoplasmaology Vol I. New York: Academic Press Inc; 1983. p. 137-46.
  - Shim H-S, Noh S, Park A-R, Lee Y-N, Kim J-K, Chung H-J, et al. Detection of sexually transmitted infection and human papillomavirus in negative cytology by multiplex-PCR. BMC Infect Dis. 2010;10:284.
  - Shipitsyna E, Zolotoverkhaya E, Dohn B, Benkovich A, Savicheva A, Sokolovsky E, et al. First evaluation of polymerase chain reaction assays used for diagnosis of *Mycoplasma genitalium* in Russia. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2009;23(10):1164-72.
  - Shu HW, Liu TT, Chan HI, Liu YM, Wu KM, Shu HY, et al., Genome sequence of the repetitive-sequence-rich *Mycoplasma fermentans* strain M64. J Bacteriol. 2011;193(16):4302-03.
  - Stakenborg T, Vicca J, Verhelst R, Butaye P, Maes D, Naessens A, Claeys G, De Ganck C, Haesebrouck F, Vaneechoutte M. Evaluation of tRNA Gene PCR for Identification of *Mollicutes*. J Clin Microbiol. 2005; 43(9):4558-66.
  - Stellrecht KA, Woron AM, Mishrik NG, Venezia RA. Comparison of multiplex PCR assay with culture for detection of genital mycoplasmas. J. Clin. Microbiol. 2004;42(4):1528-33.
  - Su HC, Hutchison III C, Giddings MC. Mapping phosphoproteins in *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumonia*. BMC Microbiology. 2007;7:63.

- Sung H, Kang SH, Bae YJ, Hong JT, Chung YB, Lee CK, Song S. PCR-based detection of *Mycoplasma* species. J. Microbiol. 2006;44(1):42-49.
- Svenstrup HF, Jensen JS, Bjornelius E, Lidbrink P, Birkelund S, Gunna C. Development of a quantitative real – time PCR assay for detection of *Mycoplasma genitalium*. J Clin Microbiol 2005; 43:3121-28.
- Takahashi S, Takeyama K, Miyamoto S, Ichihara K, Maeda T, Kunishima Y, et al. Detection of *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, and *Ureaplasma parvum* DNAs in urine from asymptomatic healthy young Japanese men. J Infect Chemother. 2006;12:269-271.
- Taylor - Robinson D, Davies HA, Sarathchandra P, Furr PM. Intracellular location of mycoplasmas in cultured cells demonstrated by immunocytochemistry and electron microscopy. Int. J. Exp Pathol. 1991;72:705-14.
- Teng C, Li M, Yu W, Li H, Shen D, Liu D. Comparison of PCR with culture for detection of *Ureaplasma urealyticum* in clinical samples for patients with urogenital infections. J. Clin. Microbiol. 1994;32(9):2232-34.
- Thurman KL, Cowart KC, Winchell JM. Comparison of nucleic acid extraction methods for the detection of *Mycoplasma pneumoniae*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009;65:435-38.
- Tsai S, Wear DJ, Shih JW, Lo SC. Mycoplasma and oncogenesis persistent infection and multistage malignant transformation. Proc Natl Acad Sci. USA. 1995;92:10197-10201.
- Tully JG. Culture medium formulation for primary isolation and maintenance of mollicutes. En: Razin S, Tully JG, editores. Molecular and Diagnostic Procedure in Mycoplasma Vol. I. New York: Academic Press INC; 1995. p. 33-39.
- Tully JG. Test for digitonin sensitivity and sterol requirement. En: Razin S, Tully JG, editores. Methods in Mycoplasma. Vol I. New York: Academic Press Inc; 1983.

p. 355-62.

- van der Shee C, Sluiters H, Van der Meijden WI, Van Beek P, Peerbooms P, Verbrugh H, Van Belkum A. Host and pathogen interaction during vaginal infection by *Trichomonas vaginalis* and *Mycoplasma hominis* or *Ureaplasma urealyticum*. *J. Microbiol. Meth.* 2001;61-67.
- van Kuppeveld FJM, Van der Logt JTM, Angulo AF. Genus and Species-Specific Identification of Mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Applied and Environmental Microbiology.* 1992;58(8):2606-15.
- Vandepitte J. Sexually transmitted diseases En: Vandepitte J, Verhaegen J, Engbaek K, Rohner P, Piot P, Heuck CC, editores. *Basic laboratory procedures in clinical bacteriology.* Geneva: WHO; 2003. p: 75-85.
- Velleca WM, Bird BR, Forrester FT. *Laboratory Diagnosis of Mycoplasma Infections.* Atlanta, Georgia. US Depart Health and Human Services. CDC; 1980.
- Vojdani A, Franco AR, Choppa P. Multiplex PCR for detection *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma penetrans* in patients with chronic fatigue syndrome, fibromyalgia, rheumatoid arthritis, and gulf war syndrome. En: Patarca-Montero R, editores. *Chronic fatigue syndrome: advance in epidemiology, clinical and basic science research.* The Haworth Press, Inc. USA; 1999. p. 187-197.
- Waites KB. Ureaplasma infection. *Emedicine (Internet).* 2000. Disponible en: <http://www.emedicine.com/med/topic2340.htm>
- Waites KB, Bebear CM, Robertson JA, Talkington DF, Kenny GE. Cumitech 34. En: *Laboratory diagnosis of mycoplasmal infection.* Washington DC: Amer. Socie. Microbiol; 2001.
- Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and Ureaplasmas as Neonatal Pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(4):757-89.

- Waites KB, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. Clin. Microbiol Rev. 2004;17(4):697-28.
- Waites KB, Taylor-Robinson D. Mycoplasma and Ureaplasma, En: Murray PR, Baron EJ, Jorguensen JH, Landry ML, Phaler MA, editores. Manual of Clinical Microbiology. 9<sup>na</sup> edición. ASM Press; 2007. p. 1004-20.
- Wetmore CM, Manhart LE, Lowens MS, Golden MR, Whittington WL, Xet-Mull AM, et al. Demographic, behavioral, and clinical characteristics of men with nongonococcal urethritis differ by etiology: a case-comparison study. Sex Transm Dis. 2011;38(3):180-86.
- Witkin SS, Kligman I, Grifo JA, Rosenwaks Z. *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* detected by the polymerase chain reaction in the cervixes of women undergoing in vitro fertilization: prevalence and consequences. J Assist Reprod Genet. 2000;12(9):610-14.
- Workowski KA, Berman SM. Sexually transmitted disease treatment guidelines 2006. Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep. 2006;55:1-94.
- Wu Y, Qui H, Zeng Y, You X, Deng Z, Yu M, Zhu C. *Mycoplasma genitalium* lipoproteins induce human monocytic cell expression of proinflammatory cytokines and apoptosis by activating nuclear factor  $\kappa$ B. Mediat. Inflama. ID.2008;195-227.
- Xiao L, Glass JI, Paralanov V, Yooseph S, Cassell GH, Duffy LB, et al. Detection and Characterization of Human Ureaplasma Species and Serovars by Real-Time PCR. Clin Microbiol. 2010; 48(8):2715-23.
- Yang H, Qu L, Ma H, Chen L, Liu W, Liu C, et al. Mycoplasma hyorhinitis infection in gastric carcinoma and its effects on the malignant phenotypes of gastric cancer cells. BMC Gastroenterol. 2010;10:132.
- Yoon BH, Romero R, Lim JH, Shim SS, Hong JS, Shim JY, Jun JK. The clinical

significance of detecting *Ureaplasma urealyticum* by the polymerase chain reaction in the amniotic fluid of patients with preterm labor. Am. J. Obstet. Gynecol. 2003;189:919-24.

- Yoshida T, Deguchi T, Maeda S, Kubota Y, Tamaki M, Yokoi S, et al. Quantitative detection of *Ureaplasma parvum* (biovar 1) and *Ureaplasma urealyticum* (biovar 2) in urine specimens from men with and without urethritis by real-time polymerase chain reaction. Sex. Transm. Dis. 2007;34:416-19.
- Yoshida T, Maeda S, Deguchi T, Miyazawa T, Ishiko H. Rapid Detection of *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum*, and *Ureaplasma urealyticum* Organisms in Genitourinary Samples by PCR- Microtiter Plate Hybridization Assay. J Clin Microbiol. 2003;41(5):1850-55.
- Zeighami H, Peerayeh SN, Yazdi RS, Sorouri R. Prevalence of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* in semen of infertile and healthy men. Int J STD AIDS. 2009;20(6):387-90.
- Zhang LD, Pei J, Zhang HM, Sun XF. Relationship between mycoplasma and chlamydia infection and lesions in the cervical tissue in high-risk HPV-positive patients. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi. 2010;24(5):346-48.

**PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DE LA AUTORA**

## PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DE LA AUTORA

### Producción científica de la autora relacionada con el tema de tesis

#### Publicaciones

- Fernández C, Alvarez K. Detección por Técnicas de Biología Molecular de *M. hominis* y *U. urealyticum* en muestras clínicas. Rev. Argentina de Microbiología. 1998;30:2.
- Fernández C, Latino M, Zamora Y, Pellecchia M, Neve V, Llanes R, Macfarlane R, Balbo L. “Desarrollo de un método de PCR-múltiple para la identificación de *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum*” Rev. Argentina de Microbiología. 2003;35(3).
- Fernández C, Zamora Y, Rodríguez N, Rodríguez I, Berdasquera D, Ortega Lm. Diagnóstico de *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum* en pacientes con vaginosis bacteriana. Rev Cubana Med Trop. 2007;59 (2)
- Rodríguez NM, Fernández C, Rodríguez I, Berdasquera D, Rivera-Tapia JA. PCR-Múltiple para el diagnóstico de *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum*. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2007;24 (2): 152-56
- Fernández C, Rodríguez N, Rodríguez I, Latino MA, Rivera-Tapia JA, Ayala. “Diagnóstico de *Mycoplasma genitalium* por amplificación del gen MgPa y el gen ARN ribosomal 16S”. Salud Pública Méx. 2008;50 (5)
- Llanes R, Rodríguez I, Fernández C y col. Manual de técnicas diagnósticas de las infecciones del tracto reproductivo. Ecimed: La Habana, 2009. (ISBN 978-959-212-386-1)
- Echevarria E, Fernández C, Rodríguez NM, Rodríguez I, Zamora Y. “Detección e identificación de micoplasmas y ureaplasmas en pacientes con síntomas uretrales”. Revista de Investigaciones Médicoquirúrgicas. 2009;1(1):102.
- Rodríguez N, Fernández C, Zamora Y, Verdasquera D, Rivera-Tapia J. Detection of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* in amniotic fluid: association with pregnancy outcomes. J Matern Fetal Neonatal Med 2011 Jan;24(1):47-50

### Resúmenes de trabajos en versión electrónica

- Fernández C, Zamora Y, Mac-Farlane R, Duque de Estrada M, Llanes R, Gallardo M. “Estudio de la presencia y la susceptibilidad antimicrobiana de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma* spp. en mujeres infértiles”. Publicación Electrónica. Rev. Latinoamericana de Microbiología. 2002;44(4).
- Fernández C, Toledo H, Acosta S, Zamora Y. Estudio de *Mycoplasma* spp. en pacientes VIH-SIDA con síntomas respiratorios. Publicación Electrónica. Rev. Latinoamericana de Microbiología. 2002;44(4).
- Zamora Y, Fernández C, Latino M, Llanes R, Díaz R, Pellecchia M, Neve V. “Desarrollo de un método de PCR-Múltiple para la detección de *Ureaplasma parvum* y *U. urealyticum*” Publicación Electrónica. Rev. Latinoamericana de Microbiología. 2002;44(4).
- Rivera A, Duque de Estrada M, Zamora Y, Fernández C, Parada D, Díaz L, Larrinaga L. “Identificación de los microorganismos mas frecuentes del tracto urogenital de mujeres infértiles” Publicación Electrónica. Rev. Latinoamericana de Microbiología. 2002;44(4).
- Zamora Y, Rodríguez N, Parada M, Almanza C; Duque de Estrada M, Llanes R, González L, Fernández C. Association of *Ureaplasmas parvum* and *U. urealyticum* with complications during the pregnancy. Int. J Infect Dis. 2004;8 (suppl. 1): S106
- Fernández C, Latino M, Zamora Y, Rodríguez N, Llanes R, Neve V. Study of *Ureaplasma parvum*, *U. urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in infertile women. Int. J. Infect. Dis. 2004;8 (suppl. 1): S106.
- Rodríguez N; Zamora Y; Parada M; Estrada M; Llanes R; Gonzalez L; Fernández C. Detection of Urogenital Mycoplasmas in Women with Bacterial Vaginosis. Int. J. Infect. Dis. 2004;8 (suppl. 1): S150

### Presentación de resultados en eventos científicos

- XVI Forum de Ciencia y Técnica: “Asociación de micoplasmas y ureaplasmas en pacientes VIH positivos con síntomas respiratorios” Carmen Fernández, Yarelys Zamora, Nadia Rodriguez y Col. 2005.
- Intercambio Científico entre Cuba-Italia. IPK-CPM Scientifica de Italia. 1ero de Nov 2005. Carmen Fernández, Nadia Rodríguez, Yarelys Zamora.
- Joven Ciencia 2005 “Detección de Micoplasmas Urogenitales en mujeres con

vaginosis bacteriana". Nadia Rodríguez, Yarelys Zamora, Carmen Fernández y Col.

- "Reunión Internacional sobre Infecciones de Micoplasmas en Humanos", Ferrara, Italia, 2007
  - Pregnancy complications associated with *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum*. Autores: Carmen Fernández Molina, Maria Agnese Latino, Nadia M. Rodríguez Preval, Islay Rodríguez, Marina Peretto, Valter Neve, Denis Berdasquera.
  - Detection of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* in endocervical specimens from HIV-1 positive women. Autores:Carmen Fernández Molina, Maria Agnese Latino, Claudia Rosso C, Daniela De Maria, Gianfranco De Intinis, Nadia M. Rodríguez Preval, Islay Rodríguez Gonzalez, Maria Elena, Denis Berdasquera, Lilian Ortega.
  - *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* in women with bacterial vaginosis. Autores: Nadia M. Rodríguez Preval, Carmen Fernández Molina, Yarelys Zamora Martinez, Islay Rodríguez Gonzalez, Denis Berdasquera, Lilian Ortega, Maria M. Estrada.
  - Development of Multiplex PCR for detecting *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum*. Autores:Nadia M. Rodríguez Preval, Carmen Fernández Molina, Islay Rodríguez Gonzalez, Denis Berdasquera, Maria Agnese Latino, Alda Alfarano, Luciano Balbo.
- VIII Congreso Centroamericano y del Caribe de Parasitología y Medicina Tropical. La Habana, Cuba. Diciembre. 2007
  - PCR-Múltiple para la detección de *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum*. Autores: Nadia M. Rodríguez Preval, Carmen Fernández Molina, Islay Rodríguez Gonzalez, Denis Berdasquera, Maria Agnese Latino, Alda Alfarano, Luciano Balbo.
  - *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum* en mujeres con vaginosis bacteriana. Autores: Nadia M. Rodríguez Preval, Carmen Fernández Molina, Yarelys Zamora Martinez, Islay Rodríguez Gonzalez, Denis Berdasquera, Lilian Ortega, Maria M. Estrada.
  - Detección de *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum* en muestras endocervicales de mujeres VIH-1 positivas. Autores: Carmen Fernández

Molina, Maria Agnese Latino, Claudia Rosso C, Daniela De Maria, Gianfranco De Intinis, Nadia M. Rodríguez Preval, Islay Rodríguez Gonzalez, Maria Elena, Denis Berdasquera, Lilian Ortega.

- Complicaciones del embarazo asociadas con *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum*. Autores: Carmen Fernández Molina, Maria Agnese Latino, Nadia M. Rodríguez Preval, Islay Rodríguez, Marina Peretto, Valter Neve, Denis Berdasquera.
- VIH/SIDA-ITS 2008, Varadero, Cuba 4-9 mayo.
  - “Estudio de *Mycoplasma* spp. en pacientes VIH/SIDA con síntomas respiratorios”. Fernández C, Toledo H, Acosta S, Zamora Y, Rodríguez N, Ortega LM.
- XXVI Conferencia Científica del CIMEQ 2009. Echevarria E, Fernández C, Rodríguez NM, Rodríguez I, Zamora Y. “Detección de micoplasmas y ureaplasmas urogenitales en pacientes con síntomas uretrales”
- XIX Jornada Científica-Técnica Hospital Militar Central “Dr. Carlos J Finlay”. Echevarria E, Fernández C, Rodríguez NM, Rodríguez I, Zamora Y. “Detección de micoplasmas y ureaplasmas urogenitales en pacientes con síntomas uretrales.
- Congreso 70 Aniversario del IPK. VIII Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. IV Congreso Nacional de Medicina Tropical. Junio 2009.
  - Fernández C, Rodríguez NM, Echevarria E y Mondeja B. “Métodos convencionales y de avanzada para la detección e identificación de micoplasmas y ureaplasmas urogenitales”
  - Fernández C, Rodríguez NM, Echevarria E y Mondeja B. “Diagnóstico de micoplasmas y ureaplasmas asociados a trastornos urogenitales. Resultados en Cuba”
  - Rodríguez NM, Fernández C, Echevarria E y Mondeja B. “Estudio de micoplasmas y ureaplasmas urogenitales en mujeres con trastornos asociados a infertilidad”
  - Rodríguez NM, Fernández C, Echevarria E y Mondeja B. “Detección de *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum* en líquido amniótico: Asociación con resultados adversos del embarazo”
  - Mondeja B, Fernández C, Rodríguez NM y Echevarria E “Estudio comparativo de tres estuches diagnósticos para la detección de micoplasmas urogenitales”

- Congreso de Biotecnología Habana 2009. Noviembre 2009.
  - Fernández C, Rodríguez NM, Echevarria E y Mondeja B. “Diagnóstico por PCR-Múltiple de Ureaplasma parvum y U. urealyticum en mujeres VIH-1 positivas”.
  - Echevarría E, Fernández C, Rodríguez NM, Rodríguez I, Mondeja B. “Detección de micoplasmas y ureaplasmas urogenitales en pacientes con síntomas uretrales”
- Jornada Científica BTJ-IPK. 30 de Noviembre. 2010
  - “Detección de Ureaplasma parvum y Ureaplasma urealyticum en líquido amniótico: asociación con resultados adversos del embarazo”. N. Rodríguez, C. Fernández.

### Resultados científicos

- 1992. “Tecnologías de Avanzadas en el diagnóstico de Micoplasmas”. Fernández C, Martínez A, Martínez S. (CENSA)(Premio Anual al Mérito Científico-Técnico del MES.)
- 1993. “Aplicación de Técnicas de Avanzada en Cuba para el Diagnóstico de Micoplasmas y Organización de un Laboratorio Nacional de Referencia”. Fernández C., Martínez A. (CENSA)(Premio Nacional ACC, y Premio Relevante 8 Forum Provincial).
- 1994. “Resultados del Centro Nacional de Referencia de Mycoplasma”. Carmen Fernández (CENSA) (9 Forum Nacional de CT, Mención Especial)
- 1996. “Detección por tecnologías de genes de Micoplasmas urogenitales en muestras respiratorias de pacientes VIH-SIDA”. Fernández C. (IPK).
- 2002. “Aportes de laboratorio al diagnóstico de las especies de micoplasmas y ureaplasmas de interés humano”. Carmen Fernández, Yarelys Zamora. (IPK)
- 2004. “Asociación de micoplasmas y ureaplasmas en pacientes VIH positivos con síntomas respiratorios”. Carmen Fernández, Yarelys Zamora, Nadia Rodríguez, Denis Berdasquera, Silvio Acosta, Rene Díaz, Luis Muy, Alfredo Pérez, Daniel Pérez. (IPK).

### Tutorías y asesorías de tesis

- Tesis de Residente de Microbiología. “Detección de micoplasmas respiratorios en pacientes VIH positivos”. IPK. 1996. Dr. Luis Muy.
- Trabajo de Diploma. Facultad de Biología. Universidad de La Habana. “Detección de micoplasmas en humanos por Hibridación de ácidos nucleicos y PCR”. IPK. 1996. Estudiante Karen Álvarez
- Tesis de Maestría en Infectología.” Micoplasmas y su asociación a trastornos respiratorios en pacientes VIH/SIDA. IPK, 1997. Dr. Alfredo Pérez
- Tesis de Residente de Microbiología y de Máster en Ciencias en Bacteriología-Micología “Aislamiento e identificación de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* en muestras endocervicales de pacientes seropositivas al VIH”. IPK. 1997. Dra. Linet Alemán
- Tesis de Maestría en Infectología. Infección de micoplasmas en pacientes VIH/SIDA con enfermedades respiratorias. IPK, 1998. Dr. Silvio Acosta.
- Tesis de Maestría en Bacteriología-Micología “Estudio de la presencia de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* en mujeres estériles”. IPK. 2001. Lic. Roberto Mac Farlane.
- Tesis de Maestría en Bacteriología-Micología “Desarrollo de un PCR Múltiple para la identificación de *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum*. IPK. 2002. Lic. Yarlys Zamora
- Tesis de Maestría en Microbiología Identificación de los microorganismos mas frecuentes del tracto urogenital de mujeres infértiles” UH 2003. Lic. Ariagna Rivera.
- Trabajo de Diploma. Facultad de Biología. Universidad de La Habana. “Estudio de *U. parvum* y *U. urealyticum* en muestras de líquido amniótico. 2005. Estudiante Lorena Estrada.
- Tesis de Maestría en Bacteriología-Micología: “Diagnóstico de *Mycoplasma genitalium* por métodos moleculares basados en la amplificación del ADN”, 2007. IPK. Lic. Nadia M. Rodríguez.
- Tesis de Maestría en Atención Integral a la Mujer. “Infecciones cérvico - vaginales en pacientes atendidas en consulta de infertilidad. Análisis de un año”. Facultad General Calixto García Iñiguez. Hospital Docente Ginecobstétrico “América Arias. Ciudad de La Habana - 2007. Dra. Liset Román Fernández

- Trabajo de Diploma. Instituto Politécnico de Química “Mártires de Girón”. “Detección de micoplasmas urogenitales en pacientes con síntomas uretrales”. abril/2008. Estudiante Eduardo Echevarría Pérez,
- Trabajo de Diploma. Facultad de Biología. “Evaluación de tres estuches diagnósticos comerciales para la detección de micoplasmas urogenitales”. Estudiante Brian Mondeja Rodríguez. Julio 2009.
- Tesis a Residente de Microbiología “Estudio de Micoplasmas y Ureaplasmas en pacientes con sepsis urinaria” Dra. Isabel del Carmen Rodríguez. Septiembre 2010 – Agosto 2011.

### **Producción científica de la autora no relacionada con el tema de tesis**

#### **Publicaciones**

- Martínez S, Fuentes E, Fernández C, Sánchez L, González M. Influencia de los medios y sistemas de cultivo en la producción de toxina de *Clostridium hemolyticum*. I. Crecimiento y concentración de toxina de *E. coli* Ry1082 pCB120 en medio Luria Bertani con diferentes suplementos. Rev. Salud Animal. 1987;9:195-200.
- Fernández C, Fernández A, Martínez S, García E, Lescaille L. y Santizo C. Presencia de bacteriófagos en cultivos toxigénicos de *Clostridium hemolyticum*. Rev. Salud Animal. 1989;11:1-4.
- Johansson KE, Mattsson JG, Jacobsson K, Fernández C, Bergström K, Bölske G, Wallgren P, Göbel U.B. Specificity of oligonucleotide probes complementary to evolutionary variable regions of 16S rRNA from *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis*. Res. Vet. Sci. 1992;52:195-204.
- Fernández C, Mattsson JG, Bölske G, Levinsohn S, Johansson K. Species-specific oligonucleotide probes complementary to 16S rRNA of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. Res. Vet. Sci. 1993;55:130-136.
- Levinsohn S, Fernández C, Jackwood MW, Johansson KE. The use of rDNA probes for detection of avian mycoplasmas. Proceeding of the Forty-second Western Poultry Disease Conference. Sacramento, California; 1993. p 78-80.
- Carmen Fernández. “Development of rDNA Probes for Detection and Identification of Porcine and Avian Mycoplasmas” [Tesis Maestría en Microbiología Clínica y

Microbiología Veterinaria] Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, Sweden. 1994.

- Chávez Y, Bascuñana C, Bölske G, Mattsson JG, Fernández C, Johansson KE. In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR. Elsevier. Veterinary Microbiology 1995;47,183-190.
- Chávez Y, Fernández C, Johansson KE. PCR en el diagnóstico veterinario de micoplasmas. Biotecnología Aplicada. 1996;13:1:35.
- Fernández C, Chávez YR. Aplicación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para la Detección de Micoplasmas en Cultivos de Células. Rev. Salud Animal. 1996; 18(1):31-34.
- Martínez A, Fernández C. Detección e Identificación de Micoplasmas en Cultivos Cultivos de Células. Rev. Salud Animal. 1996;18(1):1-4.
- Martínez S, Fernández C, Camacho M, Duarte C. Diferenciación de *Leptospira* ssp. por PCR. Rev. Biotecnología Aplicada. 1996; 13(1):40.
- Fernández C, Chávez Y. Detección e identificación de *Mycoplasma bovis* por la Reacción en Cadena de la Polimerasa basado en la amplificación del gen del ARN-ribosomal 16S. Rev. Salud Animal. 1997;19(1):15-17.
- Fernández C, Arzola A, Obregón AM. Detección e Identificación por Tecnologías de Genes de Leptospirosis Humana en Cuba. Avances en Biotec. Moderna. 1997;4. D47.
- Arzola A, Arias R, Fernández C. Identificación de Leptospiras patógenas y no patógenas por PCR-REA. Rev. Avances en Biotec. Moderna. 1999;Vol 5. D32.
- Arzola A, Lezcano M, Fernández C. Diferentes métodos de extracción del ADN Leptospiral, útiles en ensayos de PCR. Rev. Avances en Biotec. Moderna. 1999;Vol 5. D33.
- Rodríguez I, Obregón AM, Rodríguez J, Arzola A, Martínez R. y Fernández C. Detección de anticuerpos involucrados en la respuesta inmune contra la leptospirosis humana. Rev. Avances en Biotec. Moderna. 1999;Vol 5. V 12.
- Obregón AM, Martínez R, Martínez G, Rodríguez I, Rodríguez J, Arzola A, y Fernández C. Estudio inmunogénico de la fase I y II de la vacuna cubana contra la leptospirosis humana. Rev. Avances en Biotec. Moderna. 1999;Vol 5. V 5.

- Victoria B, Obregón AM, Rodríguez J, Rodríguez I, Arzola A, y Fernández C. Antígeno involucrado en la respuesta inmune contra la infección por *Leptospira interrogans* serovar canicola. Rev. Avances en Biotec. Moderna. 1999;Vol 5. D 16.
- Rodríguez I, Fuentes O. y Fernández C. Evidencias serológicas de Enfermedad de Lyme en una región de Cuba. Rev. Avances en Biotec. Moderna. 1999;Vol 5. D 12.
- Rodríguez I, Alvarez E, Fernández C. Miranda A. Comparison of a recombinant-antigen Enzyme Immunoassay with Treponema pallidum hemagglutination test for serological confirmation of syphilis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2002;Vol. 97(3):347-349.
- Rodríguez I, Fernández C, Obregon AM, Victoria B, Rodríguez J. Lepto-DipStick: resultado de su aplicación al diagnóstico rápido de la leptospirosis humana. Revista Cubana de Medicina Tropical. 2002;Vol. 1.
- Victoria B, Fernández C, Obregón AM, Rodríguez I, Rodríguez J. Identificación de aislamientos de *Leptospira interrogans* por métodos serológicos y genéticos. Revista Cubana de Medicina Tropical. 2002;Vol. 1.
- Rodríguez I, Fernández C, Obregón AM, Rodríguez J, Victoria B. Leptospirosis Humana en Cuba. Un acercamiento al conocimiento de sus principales reservorios. Bol. Epid Sem IPK. 2002;12(1)
- Rodríguez I, Obregón AM, Rodríguez J, Fernández C, Arzola A, Victoria B. Caracterización serológica de cepas aisladas de pacientes con leptospirosis humana en Cuba. Rev. Cubana Hig Epidemiol. 2002;40(1):11-5
- Rodríguez I, Fernández C, Llerena C, Victoria B, Rodríguez J, Obregón AM. Lepto dipstick: resultados de su aplicación al diagnóstico rápido de la leptospirosis humana. Rev. Cubana Med. Trop. 2002;54(1):44-7
- Victoria B, Fernández C, Rodríguez J, Obregón AM, Rodríguez I. Identificación de aislamientos de *Leptospira* por métodos serológicos y genéticos. Rev. Cubana Med. Trop. 2002;54(1):48-51
- Hurtado I, Obregón AM, Fernández C, Rodríguez J. Martínez B. Caracterización clínico - epidemiológica y de laboratorio de pacientes sospechosos de Leptospirosis estudiados en el IPK. Publicación Electrónica. Rev. Latinoamericana de Microbiología. 2002;44(4).
- Rodríguez I, Obregón AM, Fernández C. Circulación de cepas de *Leptospiras* y su vinculación con los reservorios. Publicación Electrónica. Rev. Latinoamericana de Microbiología. 2002;44(4).

- Fernández C, Obregón AM, Rodríguez J, Martínez B, Rodríguez I. Clasificación y Taxonomía de las Leptospiras. Publicación Electrónica Rev. Latinoamericana de Microbiología. 2002;44(4).
- Obregón AM, Fernández C, Rodríguez J, Martínez B, Rodríguez I. Confirmación microbiológica de un brote emergente de leptospirosis humana. Publicación Electrónica Rev. Latinoamericana de Microbiología. 2002;44(4).
- Hernández I, Obregón AM, Fernández C, Rodríguez J, Martínez B. Elaboración del *Leptospira* Latex IPK, para el diagnóstico de la leptospirosis humana. Publicación Electrónica. Rev. Latinoamericana de Microbiología. 2002;44(4).
- Martínez B, Obregón AM, Fernández C, Rodríguez J: Leptospirosis humana. Diagnóstico mediante tres técnicas serológicas: MAT, HA y Lepto Tek Lateral Flow. Publicación Electrónica. Rev. Latinoamericana de Microbiología. 2002;44(4).
- Obregón AM, Fernández C, Rodríguez J, Martínez B, Rodríguez I, Pérez M. Valor práctico de la técnica de MAT en pacientes con bajos títulos de anticuerpos IgM e IgG antileptospirales. Publicación Electrónica. Rev. Latinoamericana de Microbiología. 2002;44(4).
- Obregón AM, Fernández C, Rodríguez J, Martínez B, Rodríguez I, Martínez R, Martínez G. Respuesta serológica por ELISA y MAT en voluntarios inmunizados con VAX SPIRAL incluidos en las Fases I y II de Ensayo clínico Cubanos. Publicación Electrónica. Rev. Latinoamericana de Microbiología. 2002;44(4).
- Rodríguez J, Obregón AM, Fernández C, Rodríguez J, Martínez B. Nuevas tecnologías introducidas en función del control y la prevención de la leptospirosis humana en Cuba. Publicación Electrónica. Rev. Latinoamericana de Microbiología. 2002;44(4).
- Obregón AM, Fernández C, Rodríguez J, Martínez B, Rodríguez I. Estudio de cepas cubanas de *Leptospira interrogans* sensu lato, utilizando anticuerpos monoclonales. Relevancia de esta tecnología en el diagnóstico epidemiológico y microbiológico en Cuba. Publicación Electrónica. Rev. Latinoamericana de Microbiología. 2002;44(4).
- Martínez R, Pérez A, Quiñones MA, Cruz R, Alvarez A, Armesto M, Fernández C, Menendez J, Rodríguez I, Baró M, Diaz M, Rodríguez J, Sierra G, Obregón AM, Toledo ME, Fernández N. Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba. Pan American of Public Health/Revista Panamericana de la Salud Pública. 2004.

- Obregón AM, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J, Fernández N, Enrique G. Confirmación microbiológica de un brote de leptospirosis humana en la provincia de Villa Clara. Rev. Cub. Med. Tropical. 2003;55, 2.
- Rodríguez I, Yundart A, Otero A, Rodríguez J, Fernández C, Obregón AM. Standarization and evaluation o fan UMELISA test for detecting IgG antibodies associated with human Leptospirosis. Biotecnología Aplicada Suppl. ID. 2003:60.
- Rodríguez I, Álvarez EL, Fernández C, Miranda A. A recombinant-antigen enzyme immunoassay showed sensitivity and specificity comparable to *T. pallidum* hemagglutination test for confirmatio syphilis. 2003. ([http://www.who.int/std\\_diagnostics/literature\\_reviews/sum Rodriguez 17.htm](http://www.who.int/std_diagnostics/literature_reviews/sum_Rodriguez_17.htm))
- Rodríguez I, Pedroso R, Fernández C, Cinco M, Fuentes O.¿Enfermedad de Lyme en Cuba? Presentación de posibles casos. Rev Cubana Med Trop. 2003;55(1): 41-3
- Obregón AM, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J. Impacto práctico del uso de la tecnica de MAT en la deteccion de bajos titulos de Ac IgM e IgG en pacientes con Leptospirosis humana. Rev. Bioquímica. Mexico. 2004;Vol 29 No especial : 89.
- Obregón AM, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J, Martínez B. Lepto Dip Stick y Lepto Dri Dot , tecnicas utiles en el diagnostico rápido de la Leptospirosis humana en Cuba. Rev. Bioquímica. 2004. Mexico Vol 29 No. especial : 90.
- Obregón AM, Martínez B, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J. Lepto Tek Lateral Flow: tecnología serológica de avanzada para el diagnostico rápido de la Leptospirosis humana. Rev. Bioquímica 2004. Mexico. Vol 29 No. especial: 91.
- Obregón AM, Rodríguez I, Rodríguez J, Fernández C. Resultados de la evaluación de la inmugenicidad de la vacuna cubana vax SPIRAL contra la Leptospirosis humana por las tecnicas de ELISA y MAT. Rev. Bioquímica Mexico. 2004;Vol 29 No. especial: 92.
- Rodríguez I, Rodríguez ME, Fernández C, Blanco O, Llop A. Diagnóstico serológico de sífilis en pacientes cubanos con VIH/SIDA. Rev. Cubana de Medina Tropical. 2004;56(1):67-9
- Rodríguez I, Pérez A, Rodríguez ME, Blanco O, Lazo O, Fernández C. Syphilis in HIV-positive and negative risk groups. Int J Infect Dis; 2004;8 (suppl. 1): S206-S207.
- Rodríguez I, Álvarez EL, Fernández C. Evaluación de un ensayo inmunoenzimático recombinante como prueba confirmatoria en el diagnóstico de la sífilis. <http://www.siicsalud.com/des/des037/04429011.htm>; 2004.

- Obregón AM, Saltarén A, Rodríguez J, Rodríguez I, Fernández C. First approach in Cuba about the classification of leptospire strains by monoclonal antibodies. *Int J Infect Dis* 2004; 8 (suppl. 1): S129.
- Obregón AM, Fernández C, Rodríguez J, Rodríguez I, Martínez B, Barrios R. Application of advanced serological technologies in Cuba, to confirm human leptospirosis. *Int J Infect Dis*; 2004;8 (suppl. 1): S129-S130
- Obregón AM, Rodríguez I, Rodríguez J, Fernández C y cols. Primer estudio serológico de evaluación de la inmunogenicidad por ELISA y MAT de los voluntarios de Fases I y II incluidos en el protocolo de la vacuna cubana contra la Leptospirosis humana. *Rev. Cub. Med. Trop.* 2004;Vol 56, No 2.
- Obregón AM, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J, Martínez B, Balbis Y. Estudio de un sistema latex serovar específico para el diagnóstico rápido de la Leptospirosis humana en Cuba. *Pan American J. of Public Health. Librería ONLINE.* 2004.
- Rodríguez I, Martínez R, Zamora Y, Rodríguez JE, Fernández C, Obregón AM. Response of antileptospira IgG antibodies in individuals immunized with vax-SPIRAL. *Rev Cubana Med Trop.* 2005;57 (1): 32-7
- Rodríguez I, Rodríguez JE, Fernández C. Alkalinization of human urine for the experimental isolation of leptospiras. *Rev Cubana Med Trop.* 2005;57 (1): 55-6
- Martínez B, Obregón AM, Fernández C, Rodríguez J, Rodríguez I. Lepto tek lateral flow: a method for the rapid diagnosis of human leptospirosis in Cuba. *Rev Cubana Hig Epidemiol.* 2005;43 (1): 0-0.
- Obregón AM, Fernández C, Battle MC, Rodríguez J, Rodríguez I, Hernández H. Resultados preliminares de la evaluación del primer sistema latex en el diagnóstico rápido de la leptospirosis humana en Cuba. *Rev Cubana Hig Epidemiol.* 2005;43 (2).
- Hartskeerl RA, Smits HL, Korver H, Goris MGA, Terpstra WJ, Fernández C, Obregón AM, Rodríguez I, Zamora Y, Rodríguez N, Rodríguez JE. Manual de Laboratorio para el 3<sup>er</sup> Taller Internacional sobre leptospirosis. PALCOGRAF. 3<sup>era</sup> EDICION, 2006.
- Fernández C, Rodríguez J, Obregón AM, Rodríguez I. Vigilancia Clínica y Epidemiológica de la Leptospirosis Humana en Cuba y Honduras. Informe Proyecto de Cooperación Técnica entre Países-OPS/OMS- 2006.

- Rodríguez I, Fernández C, Martínez MB. Falsos biológicos positivos por VDRL en el diagnóstico serológico de la sífilis. Rev Cubana Med Trop. 2006;58 (1).
- Rodríguez I, Fernández C, Obregón AM, Zamora Y, Rodríguez J, Rodríguez N, Berdasquera D, Llop A. Confirmación microbiológica de dos brotes emergentes de leptospirosis humana en Cuba. Rev. Cubana Med. Trop. 2007;59 (1).
- Obregón AM, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J, Zamora Y, Berdasquera D. Avances de laboratorio en el diagnóstico serológico y la investigación de la Leptospira humana en Cuba. Rev. Cubana Med. Trop. 2007;59 (1).
- Zamora Y, Fernández C, Rodríguez I, Obregón AM, Rodríguez J, Rodríguez N. Método de la reacción en cadena de la polimerasa en la detección temprana de Leptospira spp. en hemocultivos de pacientes con sospecha de leptospirosis. Rev. Cubana Med. Trop. 2007;59 (1).
- Obregón AM, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J. The application of monoclonal antibody methodology as a tool for serotyping leptospira isolates in Cuba. Rev. Cubana Med. Trop. 2007;59 (1).
- Berdasquera D, Rodríguez I, Obregón AM, Fernández C, Segura R, Bustabab EC, Sánchez CM. Brote de leptospirosis humana en la provincia Guantánamo. Rev. Cubana Med. Trop. 2007;59 (1).
- Fernández C, Zamora Y, Rodríguez N, Rodríguez I, Berdasquera D, Ortega Lm.. Diagnóstico de *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum* en pacientes con vaginosis bacteriana. Rev Cubana Med Trop 2007;59 (2)
- Rodríguez I, Lienhard R, Gern L, Veuve MC, Jouda F, Siegrist HH, Fernández C, Rodríguez JE. Evaluation of a modified culture medium for *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007;102(8):999-1002
- Rodríguez I, Ortega LM, Fernández C, Rodríguez ME, Scheurer C, Lienhard R. “Borreliosis de Lyme en Cuba. A propósito de nuevos casos”. Rev Panam Infectol. 2008.
- Rodríguez I, Gern L, Rais O, Fuentes O, González R, Fernández C. “Detección molecular de patógenos emergentes de importancia médica y veterinaria”. Rev Cubana Med Trop. 2008.
- Rodríguez I, Gern L, Rais O, Fuentes O, González R, Fernández C. Detección molecular de patógenos emergentes de importancia médica y veterinaria en

garrapatas capturadas sobre caballos domésticos. Rev Cubana Med Trop. 2009; 61(1): 57-62

- Verdasquera D, Barreras BA, Barroso J, Perez A, Fernández C, Ortega LM, Cruz AM. Mortalidad por Leptospirosis humana, Ciudad de La Habana. Rev Panam Infectol. 2009;11(4):19-26
- Rodríguez I, Ortega LM, Fernández C, Rodríguez ME, Scheurer C, Lienhard R. Borreliosis de Lyme en Cuba. A propósito de nuevos casos. Rev Panam Infectol. 2009; 11(3): 37-41
- Verdasquera D. Ortega L., Fernández C., Obregón AM., Rodríguez I., Miyar R. Enfrentamiento a brotes epidémicos de leptospirosis humana. Rev Panamericana de Infectología. 2011. (1).

### **Presentación de resultados en eventos científicos**

- 5th International Conference on Ticks and Tick-borne pathogens, Neuchatel, Suiza. "Lyme diseases. Past, current and future investigations in Cuba". Lic. Islay Rodríguez, Dra Carmen Fernández et al. 2005.
- Evento de la Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica AC. DF. México. 2005. "Agglutinación en látex un método de pesquisaje para la leptospirosis humana en Cuba" Ana Margarita Obregon, Carmen Fernández, Islay Rodríguez, José Rodríguez, Yeniffer Viera .y "Estudio de la susceptibilidad antimicrobiana en serovares de referencia de leptospiras". Ana Margarita Obregon, Carmen Fernández, José Rodríguez, Idialis Hernández.
- Reunión Científica Internacional de la Sociedad Internacional de Leptospirosis (ILS) Tailandia. 2005. "Agglutination Latex System for the rapid diagnosis of Leptospirosis in Cuba. Ana Margarita Obregon, Carmen Fernández, Islay Rodríguez, José Rodríguez, Yeniffer Viera.
- III Taller y Tercera Reunión Científica Internacional "Leptospirosis Habana 2006", presentando los trabajos titulados:
  - Avances de laboratorio en el diagnóstico serológico y la investigación, de la Leptospirosis humana en Cuba. Autores: Lic. Ana Margarita Obregón, Dra Carmen Fernández, Lic Islay Rodríguez, Téc. José Rodríguez.
  - Uso del cebador M16 en la técnica de RAPD para la identificación de leptospiras. Autores: Lic. Ana Margarita Obregón, Dra Carmen Fernández, Lic Islay Rodríguez, Téc. José Rodríguez..

- Aplicación de la técnica de la PCR para la detección temprana de *Leptospiras interrogans* en hemocultivos procedentes de pacientes cubanos. Autores: Zamora Y, Fernández C, Rodríguez I, Obregón AM, Rodriguez J, Rodríguez N.
- Informática en Salud 2007. La Habana, Cuba: 12/febrero al 12/abril
  - Importancia de la estratificación epidemiológica en un brote de leptospirosis en la provincia Guantánamo. Autores: Denis Berdasquera, Islay Rodríguez, Ana M. Obregón, Carmen Fernández
- VIII Congreso Centroamericano y del Caribe de Parasitología y Medicina Tropical. La Habana, Cuba. Diciembre. 2007
  - First approach about the classification by monoclonal antibodies of leptospire strains. Autores: Ana M Obregón, Carmen Fernández, Islay Rodríguez, Jose Rodriguez, Yaindrys Rodriguez, Roxana Blanco, Yanais Valdés.
  - Estudio sobre la susceptibilidad antimicrobiana en cepas de leptospiras. Autores: Ana M Obregón, Carmen Fernández, Islay Rodríguez, José Rodríguez, Rafael LLanes, Yarelys Zamora, Yaindrys Rodriguez, Roxana Blanco Yanais Valdés, Diadenys Lemus.
  - Enfermedad de Lyme: una nueva entidad infecciosa a tomar en consideración en Cuba. Autores: Islay Rodríguez, Reto Lienhard, Carmen Fernández, Cloe Scheurer, Roberto González, Hans H. Siegrist, Ana M. Obregón, Bárbara Martínez, José E. Rodríguez
  - Mesa redonda sobre Actualización en Leptospirosis: Vigilancia Microbiológica de la Leptospirosis humana. Carmen Fernández
- XI Reunión – Taller Nacional “Enfrentamiento de las Enfermedades Zoonóticas en Cuba” Las Tunas – 25 27 de Marzo 2008. “Vigilancia Microbiológica, Referencia de leptospirosis y Proyectos de Investigación” C. Fernández
- IV Reunión Científica “Leptospirosis Habana 2008”. La Habana, 22-23/mayo.
  - “Prevalencia de anticuerpos contra *Leptospira interrogans* sensu lato en móridos urbanos. Autores: Islay Rodríguez, Jorge Cantillo, Ariamys Companioni, Natividad Hernández, Carmen Fernández, Ana M. Obregón, José E. Rodríguez, Roxana Blanco, Yaindrys Rodríguez.
  - “Nuevos métodos moleculares para el diagnóstico de leptospirosis en Cuba” C. Fernández.

- VI International Conference on Ticks and Tick-borne Pathogens. Buenos Aires, Argentina, 21-26/septiembre. 2008.
  - “Advances in the study of Lyme disease in Cuba”. Autores: Rodríguez I, Gern L, Fernández C, Fuentes O, González R, Siegrist HH, Tritten ML, Obregón AM, Rodríguez JE, Lienhard R.
- Biotecnología Habana 2008, Ciudad de La Habana, Cuba, 4-6/diciembre
  - “Optimización de tecnologías moleculares para la detección de *Borrelia burgdorferi* sensu lato en garrapatas”. Autores: Islay Rodríguez, Milagro Mayet, Carmen Fernández, Jorge Fraga, Yanisia Duarte, Eduardo Echevarría.
- Jornada provincial del CPEHM de Ciudad de La Habana. Convención 2008-diciembre.
  - Presidenta de Mesa redonda sobre ”Leptospirosis” . C. Fernández
- VIH/SIDA-ITS 2008, Varadero, Cuba 4-9 mayo.
  - “Sífilis asintomática en individuos seropositivos al VIH”. Islay Rodríguez, Yudelquis Aldana, Antonio Pérez, Carmen Fernández, Lucía Díaz, René Ortega, Elda Macías, Graciela Herrera, María E. del Río.
- III Congreso Latinoamericano de Zoonosis -VI Congreso Argentino de Zoonosis. Junio 2008, Buenos Aires, Argentina.
  - “Amplificación de un fragmento de de ADN leptospiral extraído de tejidos en bloque de parafina” . Y Zamora, C Fernández, A M Obregón, I Rodríguez, Y Rodríguez, J Rodríguez, Y Valdés.
- XIV Jornada Científica Veterinaria. Pinar del Río. Octubre 2009. Fernández Carmen. Conferencia Magistral “Leptospirosis y Ecosistema”
- Congreso 70 Aniversario del IPK. VIII Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. IV Congreso Nacional de Medicina Tropical. Junio 2009.
  - Fernández C. “Zoonosis Bacterianas”. Conferencia.
  - Fernández C, Obregon AM, Rodríguez I, Berdasquera D, Ortega L, Zamora Y, Rodríguez Y, Rodríguez J, Valdés Y. “Abordaje clínico-epidemiológico y microbiológico de la leptospirosis en salud humana y veterinaria en Cuba.
  - Rodríguez I, Fernández C. “Diagnóstico de laboratorio de la sífilis venérea en Cuba por pruebas treponémicas y no treponémicas, la experiencia en el IPK”

- Rodríguez I, Fernández C. “Optimización de tecnologías moleculares para la detección de *Borrelia burgdorferi* sensu lato en garrapatas”
- Rodríguez I, Fernández C. “Nuevos aportes al conocimiento sobre enfermedad de Lyme en Cuba”
- Rodríguez Y, Fernández C. “Implementación de una variante de la técnica MAT para la pesquisa de leptospirosis humana”
- Zamora Y, Fernández C, “Caracterización de cepas de leptospiras circulantes en Cuba en el periodo 2006-2008”
- Obregón AM, Fernández C. “Fenotipical differentiation of strain isolate from leptospirosis cases in Cuba”
- Obregón AM, Fernández C. “Impacto de las tecnologías rápidas en el diagnóstico de la leptospirosis humana en Cuba”
- Congreso de Biotecnología Habana 2009. Noviembre 2009.
  - Obregón AM, Fernández C. “Los anticuerpos monoclonales y su papel en el diagnóstico de avanzada de la leptospirosis humana”
  - Rodríguez I, Fernández C. “PCR Múltiple para la detección de *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp. y *Babesia* spp.”
- Talleres Internacionales.
  - Fernández C. “Abordaje de la Leptospirosis con enfoque del ecosistema”. Rep. Dominicana. Febrero 2009
  - Fernández C. “Abordaje de la Leptospirosis con enfoque del ecosistema”. Honduras. Marzo 2009.
- Reunión Nacional de Zoonosis. 1 y 2 de Diciembre, 2010 .
  - “Informe del Laboratorio Nacional de Referencia de Leptospiras”. Dra. Carmen Fernández
- Jornada Científica BTJ Bacteriología-Micología. Septiembre. IPK, 2010.
  - “Caracterización de aislamientos autóctonos de *Leptospira* spp. en Cuba”. Y. Rodríguez, Y. Zamora, A.M. Obregón, I. Rodríguez, V. Vásquez, J. Rodríguez, Y. Valdés, N. Rodríguez, C. Fernández.
  - “Comportamiento del control de la calidad del diagnóstico serológico de la leptospirosis humana en Cuba (2005-2009)”. Y. Valdés, I. Rodríguez, C. Fernández, A.M. Obregón, Y. Rodríguez, J.E. Rodríguez.

- Valor práctico del líquido cefalorraquídeo en la Hemoaglutinación de *Treponema pallidum* para la confirmación de neurosífilis. E. Echevarria, I. Rodríguez, C. Fernández.
- Jornada Científica BTJ-IPK. 30 de Noviembre. 2010
  - “Caracterización de aislamientos autóctonos de *Leptospira* spp. en Cuba”. Y. Rodríguez, Y. Zamora, A.M. Obregón, I. Rodríguez, V. Vásquez, J. Rodríguez, Y. Valdés, N. Rodríguez, C. Fernández.
  - “Comportamiento del control de la calidad del diagnóstico serológico de la leptospirosis humana en Cuba (2005-2009)”. Y. Valdés, I. Rodríguez, C. Fernández, A.M. Obregón, Y. Rodríguez, J.E. Rodríguez.
  - Valor práctico del líquido cefalorraquídeo en la Hemoaglutinación de *Treponema pallidum* para la confirmación de neurosífilis. E. Echevarria, I. Rodríguez, C. Fernández.
- Jornada Científica ANIR. Septiembre-Octubre. IPK. 2010
  - Valor práctico del líquido cefalorraquídeo en la Hemoaglutinación de *Treponema pallidum* para la confirmación de neurosífilis. E. Echevarria, I. Rodríguez, C. Fernández.
- I Congreso Internacional “Espiروetas Habana 2010”. 5 al 7 de Mayo 2010.
  - “Fortalecimiento de la Vigilancia Microbiológica de la Leptospirosis en Cuba y sus Proyecciones”. C. Fernández-Molina, A.M. Obregón-Fuentes, I. Rodríguez-González, Y. Rodríguez-Olivera, J.E. Rodríguez-Silveira, Y. Valdés-Labrador, E. Echevarría-Pérez, B.A. Mondeja-Rodríguez
  - “Caracterización de aislamientos autóctonos de *Leptospira* spp. en Cuba”. Y. Rodríguez, Y. Zamora, A.M. Obregón, I. Rodríguez, V. Vásquez, J. Rodríguez, Y. Valdés, N. Rodríguez, C. Fernández.
  - “Impacto de los sistemas serológicos modernos en el pesquisaje rápido de la leptospirosis humana”. A.M. Obregón, C. Fernández, I. Rodríguez, Y. Rodríguez, J. Rodríguez, Y. Valdés
  - “Comportamiento del control de la calidad del diagnóstico serológico de la leptospirosis humana en Cuba (2005-2009)”. Y. Valdés, I. Rodríguez, C. Fernández, A.M. Obregón, Y. Rodríguez, J.E. Rodríguez

- “Comportamiento de la confirmación serológica de sífilis por HATP en Cuba” (septiembre/2009-marzo/2010). E. Echevarria, I. Rodríguez, Y. Valdés, C. Fernández, R. Llanes
- “Enfermedad de Lyme: una borreliosis exclusiva del hemisferio Norte?” I. Rodríguez, C. Fernández, O. Fuentes
- “PCR múltiple para la detección de *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp. y *Babesia* spp.: diseño y evaluación”. I. Rodríguez, C. Burri, V. Douet, C. Fernández, Y. Duarte, E. Echevarría, A.A. Noda, L. Gern
- “Comparación de métodos para la extracción de ácidos nucleicos de *Leptospira interrogans* sensu lato y *Borrelia burgdorferi* sensu lato” B.A. Mondeja, A.A. Noda, I. Rodríguez, C. Fernández.

### Resultados científicos

- 1979 “Resultado Científico Vinculado a la IV Conferencia Cumbre del Movimiento de los Países No Alineados (Clasificada). Gracia JC., Fuentes E., Martínez S., Álvarez E., Fernández C. (CENSA).
- 1983. “Uso de la prueba reverso de campo en la identificación de *Clostridium perfringens* de interés veterinario” Martínez S., Fuentes E., Gracia JC., Álvarez E., Fernández C. (CENSA).
- 1984 “Aplicación de microtécnicas en la identificación de *Clostridium hemolyticum*” Martínez S., Fuentes E., Gracia JC., Alvarez E., Fernández C. (CENSA).
- 1986 “Toxina de *Clostridium hemolyticum*: Parcial purificación mediante técnicas cromatográficas y caracterización de su actividad mediante definición de su DL 50 en ratones Balb C.” González M., Sierra G., Fuentes E., Martínez S., Fernández C., Fernández A. (CENSA).
- 1988. “Bases Biotecnológicas para la obtención, purificación y caracterización de la fracción letal de *Clostridium hemolyticum*”. Fuentes E., Martínez S, Fernández C., González M., Fernández A. (CENSA)(Premio Anual al Mérito Científico - Técnico del MES).
- 1989. Diagnóstico de una enfermedad exótica en caña de azúcar” (Clasificada). Peralta EL., Anchata O., Tablada L., Martínez B., martínez S., Alvarez E., Fernández C., (CENSA) (Premio Anual al Mérito Científico - Técnico del MES).

- 1991. "Técnicas moleculares en el diagnóstico veterinario" Martínez S., Fernández A., Fernández C., camacho M., savón L., Pérez M., Coroa L., Tuero C., Barreras M. (CENSA)
- 1997. "Caracterización de un brote emergente de Leptospirosis humana en la provincia de Villa Clara". Ana Margarita Obregón Fuentes, Carmen Fernández, Islay Rodríguez, Suset Oropesa, Norma Fernández, José Rodríguez. (IPK)
- 1998. "Caracterización serológica de cepas de *Leptospira interrogans* aisladas de procesos invasivos". Islay Rodríguez, Ana Margarita Obregón, José Rodríguez, Carmen Fernández. (IPK).
- 1999. "Revolución científica técnica en el conocimiento etiológico de la Leptospirosis humana en Cuba. Avances en el último quinquenio del siglo XX. 1999". Ana Margarita Obregón, Carmen Fernández, Islay Rodríguez, José Rodríguez, Arelys Arbola, Gerardo Martínez, Alina Llop, Raydel Martínez. (IPK).
- 2001. "Evaluación de la eficacia de la vacuna cubana vax Spiral. 2001" Martínez R., Obregón AM., Fernández C. (IPK).
- 2002. "Validación del Sistema microELISA anti-tmp A, novedoso método para el diagnóstico de la Sífilis". Elvio R., Islay Rodríguez, Carmen Fernández. (IPK) (Premio Provincial, Academia Ciencias, Ciego Ávila)
- 2005. "Evidencias serológicas de Enfermedad de Lyme en Cuba. Islay Rodríguez, Carmen Fernández, Omar Fuentes, y colaboradores. IPK.

#### Tutorías y asesorías de tesis

- Lic. en Microbiología. "Detección e identificación de micoplasmas porcinos". CENSA. 1993.
- Lic. en Microbiología. "Diagnóstico de micoplasmas genital en muestras clínicas de recién nacidos". IPK, 1997.
- Master en Ciencias en Bacteriología-Micología "Evidencia serológicas de Enfermedad de Lyme en una región de Cuba" IPK, 1998.
- Master en Ciencias en Bacteriología-Micología "Diferenciación de cepas de *Leptospira interrogans* y *Leptospira biflexa* por PCR-REA" IPK, 1998.
- Master en Ciencias en Bacteriología-Micología "Evaluación de diferentes métodos de extracción de ADN para la detección de *Leptospira interrogans* por PCR" IPK, 1998.

- Master en Ciencias en Bacteriología-Micología “Validación del sistema micro-ELISA anti-Tmp A, novedoso método para el diagnóstico de la sífilis”. IPK, 1998.
- Master en Ciencias en Bacteriología-Micología Estudio de una variante de la técnica de MAT y su uso en el diagnóstico de la Leptospirosis humana. Habana. IPK 2001.
- Master en Ciencias en Bacteriología-Micología “Elaboración de un látex de producción nacional para el diagnóstico rápido de la Leptospirosis humana. Habana. IPK. 2002.
- Lic. Microbiología. “Estudio de la CMI en cepas de referencia de *Leptospira interrogans*. Habana. IPK. 2002.
- Master en Ciencias en Bacteriología-Micología “Validación del sistema látex para el diagnóstico rápido de la Leptospirosis humana”. IPK. 2003.
- Master en Ciencias en Bacteriología-Micología “LEPTOVIM: una nueva herramienta para la vigilancia de laboratorio de la Leptospirosis humana”. IPK. 2003.
- Master en Ciencias en Bacteriología-Micología “Estudio clínico, epidemiológico y de laboratorio de pacientes sospechosos de Leptospirosis humana ingresados en el hospital IPK. (enero- junio del 2002)” IPK. 2003.
- Tesis de Maestría en Infectología y Enfermedades Tropicales: “Leptospirosis Humana en pacientes hospitalizados en el IPK 2001-2006 ”, de la Dra. Vianka Calás Hechavarría. Junio/2008.
- Trabajo de Diploma. Facultad de Biología. “Identificación bioquímica, serológica y genética de leptospirosis aisladas de pacientes cubanos”, de la estudiante de Licenciatura en Microbiología Victoria Vasquez Sampiel. Julio 2009.
- Trabajo de Diploma. Facultad de Biología. “Desarrollo de un método de microdilución en caldo para el estudio de la susceptibilidad antimicrobiana de serovares de *Leptospira*”, de la estudiante de Licenciatura en Microbiología Varina Killing. Julio 2009.
- Tesis de Maestría en Bacteriología-Micología “Puesta a punto de tecnologías moleculares para la detección de *Borrelia* a partir de garrapatas” de la Lic. Milagro Mayet Rosa. 2010.
- Tesis de Maestría en Bacteriología-Micología “Vigilancia microbiológica sobre Leptospirosis - Dengue”, de la Lic. Yaindryns Rodríguez. 2010.

## **ANEXO**

## Anexo

### Estuche comercial *MYCOFAST Evolution - 2 (MFE-2)* para el diagnóstico de *M. hominis* y *U. urealyticum*

**Introducción:** El estuche MFE-2 está reportado para el diagnóstico de infecciones por micoplasmas urogenitales, sin embargo solo identifica *M. hominis* (M.h.) y *Ureaplasma* spp. (U.u.); por lo que las muestras positivas a ureaplasmas son analizadas en el LNRIM-IPK por la PCR-Múltiple para identificar las especies de *U. parvum* y *U. urealyticum*.

#### Flujograma del MFE-2

**1. Medio UMMt.** La muestra clínica se toma según las especificaciones que requiera cada una de ellas y se coloca en el frasco con el medio de transporte UMMt.

- **Muestras de hisopados:** introducir el hisopo en el frasco con medio UMMt, agitar vigorosamente, retirar el hisopo y cerrar el frasco.
- **Muestras líquidas:** en el frasco con medio UMMt inocular 200 µL de la muestra líquida, homogeneizar, cerrar el frasco.

El frasco con medio UMMt inoculado con la muestra clínica puede permanecer hasta 8 horas a temperaturas entre 18-25°C o hasta 16 horas entre 2-8°C.

#### **2. Regeneración del medio UMMLyo**

Transferir el medio UMMt con la muestra clínica a un frasco con el medio liofilizado UMMLyo y homogeneizar. El medio UMMLyo regenerado de este modo debe mostrar un color naranja.

#### **3. Inoculación de la bandeja**

- Identificar la bandeja con el código de la muestra clínica
- Remover la envoltura adhesiva y añadir a los pocillos:

del 1al 10	100 µL de UMMLyo inoculado
del 9 al 10	50 µL de suplemento M.h
del 1-10	2 gotas de aceite parafina.
- Recubrir los pocillos con la envoltura adhesiva.

**El frasco con el resto del medio UMMLyo, se coloca en una incubadora a 37°C. Si la muestra por el MFE-2 es positiva a *Ureaplasma* spp. se toman 1 mL para la extracción del ADN y se analiza por la PCR-Múltiple para identificar *U. parvum* y *U. urealyticum* por PCR.**

#### **4. Incubación de la bandeja**

Incubar la bandeja a 37°C ± 1°C durante 24 horas.

Para la enumeración de U.u, leer los resultados en 24 horas. Para la detección de M. h incubar hasta 48 horas.

Nota: La incubación para muestras de orina, semen y secreciones gástricas puede ser continuada hasta las 72 horas.

#### **5. Lectura e interpretación**

##### **Validación**

Chequear que los dos pocillos (U.u.) (M.h.) estén claros o transparentes. Una apariencia empañada indica contaminación bacteriana. En ese caso, repetir el análisis.

##### **Lectura**

Los resultados se leen en dependencia del color obtenido en los diferentes pocillos. El crecimiento de micoplasmas urogenitales se indica cuando el medio se torna rojo (alcalino). El medio se mantiene amarillo cuando no ocurre crecimiento de micoplasmas urogenitales.

Nota: una coloración naranja debe ser considerada como un resultado positivo

##### **Identificación (pocillos 7, 8 y 9)**

La identificación está hecha basada en el cambio de coloración de pocillos específicos, además de la observación de los pocillos 7, 8 y 9 la cual determina el perfil de identificación de especie:

	Color en el pocillo #		
	7(L)	8(STX)	9(E)
<i>U. urealyticum</i>	rojo	rojo	amarillo
<i>M. hominis</i>	amarillo	rojo	rojo

##### **Cuantificación de UCC/mL (pocillos 1, 2, 3 y 10)**

La cuantificación de micoplasmas urogenitales ha sido validada en muestras en las cuales pueden estar presentes en estado de comensales (muestras cérvico-vaginales y uretrales).

Color rojo observado en el pocillo #	Interpretación (Mycofast UCC/mL)
1	Valor de U. u de $10^3$
1 y 2	Valor de U. u de $10^4$
1, 2 y 3	Valor de U. u de $\geq 10^5$
10	Valor de U. u de $\geq 10^4$

Cualquier evidencia de *U. urealyticum* y *M. hominis* en muestras normalmente estériles es significativo, independientemente del nivel. En humanos, los criterios de interpretación para *U. urealyticum* son:  $\geq 10^4$  UCC/mL para muestras uretrales y  $\geq 10^3$  UCC/mL para la primera micción.

**Prueba de resistencia antimicrobiana (pocillos 4, 5 y 6).**

**Perfil de resistencia:** cuando el medio se torna rojo, la cepa es resistente al antibiótico a la concentración contenida en el pocillo.

**Perfil de no-resistencia:** cuando el medio permanece amarillo el crecimiento de la cepa ha sido inhibido por la presencia del antibiótico a la concentración contenida en el pocillo.

Los pocillos reservados a la prueba de resistencia no contienen el suplemento SMh. En caso de un resultado positivo para *M. hominis*, la lectura e interpretación del perfil de resistencia debe realizarse después de 48 horas de incubación. Debido a que el hecho de que el inóculo no está estandarizado, los resultados de cuantificación deben tenerse en cuenta para la interpretación de la resistencia a antibióticos.