

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

40.

**Diagnóstico microbiológico
de las infecciones por
Mycoplasma spp. y
Ureaplasma spp.**

2 0 1 1

Coordinadora: **María Antonia Meseguer Peinado**

Autoras: **Beatriz Acosta Boga
María Gema Codina Grau
Lurdes Matas Andreu
María Antonia Meseguer Peinado**



ISBN- 978-84-615-6537-5

INDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

1. Introducción

2. Características biológicas de los micoplasmas

3. Infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*

- 3.1. Infecciones respiratorias
 - 3.1.1. Introducción
 - 3.1.2. Factores de patogenicidad
 - 3.1.3. Patogenia de la infección
 - 3.1.4. Epidemiología
 - 3.1.5. Manifestaciones clínicas
- 3.2. Manifestaciones extrapulmonares
 - 3.2.1. Patogenia
 - 3.2.2. Manifestaciones clínicas
- 3.3. Papel de *Mycoplasma pneumoniae* en otras entidades clínicas

4. Infecciones por micoplasmas urogenitales

- 4.1. Introducción
- 4.2. Factores de patogenicidad
- 4.3. Infección genitourinaria
 - 4.3.1. Uretritis no gonocócica
 - 4.3.2. Vaginosis bacteriana
 - 4.3.3. Cervicitis
 - 4.3.4. Enfermedad inflamatoria pélvica
 - 4.3.5. Infección urinaria y litiasis
- 4.4. Infección materno-fetal
 - 4.4.1. Corioamnionitis, aborto espontáneo y parto pretérmino
 - 4.4.2. Embarazo ectópico
 - 4.4.3. Rotura prematura de membranas
 - 4.4.4. Endometritis postparto, fiebre postparto y septicemia materna
 - 4.4.5. Transmisión vertical
- 4.5. Infecciones neonatales
 - 4.5.1. Enfermedad pulmonar del neonato
 - 4.5.2. Infección sistémica
- 4.6. Otras infecciones extragenitales

5. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por micoplasmas

- 5.1. Diagnóstico serológico
 - 5.1.1. Introducción.
 - 5.1.2. Técnicas serológicas
 - 5.1.2.1. Crioaglutininas
 - 5.1.2.2. Fijación de complemento
 - 5.1.2.3. Técnicas de aglutinación de partículas sensibilizadas
 - 5.1.2.4. Técnicas de enzimoimmunoanálisis (EIA)
 - 5.1.2.5. Prueba de la inhibición metabólica.
 - 5.1.2.6. Otras técnicas
 - 5.1.3. Recogida y conservación de la muestra
 - 5.1.4. Interpretación e información de los resultados
- 5.2. Diagnóstico microbiológico basado en el cultivo
 - 5.2.1. Cultivo de *Mycoplasma pneumoniae*
 - 5.2.1.1. Obtención de la muestra
 - 5.2.1.2. Transporte y conservación
 - 5.2.1.3. Manejo de la muestra en su recepción en el laboratorio
 - 5.2.1.4. Procesamiento de la muestra
 - 5.2.1.5. Selección de medios y condiciones de incubación
 - 5.2.1.6. Cultivos
 - 5.2.1.7. Criterios de interpretación de los resultados
 - 5.2.1.8. Procedimientos adicionales a realizar en situaciones especiales

- 5.2.2. Cultivo de *Ureaplasma* spp. y *Mycoplasma hominis*
 - 5.2.2.1. Obtención de la muestra
 - 5.2.2.2. Transporte y conservación de la muestra
 - 5.2.2.3. Manejo de la muestra en su recepción en el laboratorio
 - 5.2.2.4. Procesamiento de la muestra
 - 5.2.2.5. Selección de medios y condiciones de incubación
 - 5.2.2.6. Cultivos
 - 5.2.2.7. Criterios de interpretación de los resultados
 - 5.2.2.8. Procedimientos adicionales a realizar en situaciones especiales
 - 5.2.2.9. Información de los resultados
- 5.3. Diagnóstico microbiológico no basado en el cultivo
 - 5.3.1. Técnicas de detección de antígenos
 - 5.3.2. Sondas de ADN
 - 5.3.3. Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
 - 5.3.3.1. Consideraciones generales sobre la aplicación de la técnica de PCR al diagnóstico de las infecciones por micoplasmas
 - 5.3.3.2. Micoplasmas genitales
 - 5.3.3.2.1. Introducción
 - 5.3.3.2.2. Recogida, medios de transporte y conservación de las muestras
 - 5.3.3.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa
 - 5.3.3.2.4. Amplificación de varias dianas. PCR *multiplex*
 - 5.3.3.3. *Mycoplasma pneumoniae*
 - 5.3.3.3.1. Introducción
 - 5.3.3.3.2. Recogida, medios de transporte y conservación de las muestras
 - 5.3.3.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa
 - 5.3.3.3.4. Interpretación e informe de los resultados
 - 5.3.3.3.5. Limitaciones del procedimiento
 - 5.3.4. Espectroscopía RAMAN combinada con nanobastones de plata (NA-SERS)
 - 5.3.5. Detección mediante tecnología PLEX-ID

6. Pruebas de sensibilidad a los antibióticos

- 6.1. Introducción
- 6.2. Técnicas para la determinación de la sensibilidad a los antibióticos
 - 6.2.1. Microdilución en caldo (test de inhibición metabólica)
 - 6.2.2. Equipos comerciales
 - 6.2.3. Determinación de la CMI por dilución en agar
 - 6.2.4. E-test

7. Bibliografía

DOCUMENTOS TÉCNICOS

1. PNT-M-01. Diagnóstico serológico de la neumonía por *Mycoplasma pneumoniae* mediante la técnica de aglutinación de partículas sensibilizadas
2. PNT-M-02. Procesamiento microbiológico de las muestras respiratorias y de otras localizaciones para cultivo de *Mycoplasma pneumoniae*
3. PNT-M-03. Procesamiento microbiológico de las muestras genitourinarias y de otras procedencias para cultivo de *Ureaplasma* spp. y *Mycoplasma hominis*
4. PNT-M-04. Detección de ADN de *Mycoplasma pneumoniae* mediante PCR en tiempo real
5. PNT-M-05. Técnicas para la determinación de la sensibilidad a los antibióticos de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma* spp.

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

40. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES POR *Mycoplasma* spp. y *Ureaplasma* spp. 2011

Coordinadora: María Antonia Meseguer Peinado

Autoras: Beatriz Acosta Boga
María Gema Codina Grau
Lurdes Matas Andreu
María Antonia Meseguer Peinado

1. INTRODUCCIÓN

El diagnóstico microbiológico de las infecciones causadas por micoplasmas y ureaplasmas se ha visto limitado durante mucho tiempo por el crecimiento “altamente fastidioso” de estos microorganismos, la falta de medios de cultivo comercializados, la ausencia de procedimientos diagnósticos rápidos y la percepción extendida de que estos microorganismos tienen una importancia menor en el contexto de las enfermedades infecciosas. Esta situación ha cambiado notablemente en los últimos años gracias a los avances en los métodos de diagnóstico serológico y, sobre todo, por la aplicación de los métodos de amplificación de ácidos nucleicos. El avance en la metodología ha propiciado un aumento en su detección y, consecuentemente, en la apreciación de la importancia clínica de estos microorganismos.

En este procedimiento se presenta la recopilación y puesta al día de los aspectos relacionados con la biología, determinantes de patogenicidad, significación clínica y métodos de diagnóstico microbiológico de las especies de micoplasmas y ureaplasmas de origen humano.

2. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE LOS MICOPLASMAS

Las bacterias del género *Mycoplasma* (familia *Mycoplasmataceae*, orden *Mycoplasmatales*) pertenecen a la clase *Mollicutes* (“piel blanda”) y representan un grupo de microorganismos complejos, sofisticados y únicos por su naturaleza entre los procariontes, que durante largo tiempo han

constituido, y aún constituyen, un enigma para los microbiólogos.

Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y, en la actualidad, el creciente número de especies establecidas se acerca a las 200, muchas de las cuales se comportan como comensales, mientras que otras son patógenas para el hombre, animales y plantas.

En los humanos, se han aislado 14 especies, de las cuales 12 pertenecen al género *Mycoplasma* y 2 especies (*Ureaplasma biovar parvum* y *Ureaplasma urealyticum*) pertenecen al género *Ureaplasma*. Seis de las 14 especies tienen el tracto genitourinario como su principal lugar de colonización. En la tabla 1, se muestran las especies de micoplasmas aisladas en el hombre, las principales mucosas donde se aíslan, el tipo de metabolismo que poseen y su asociación con la patología.

Los micoplasmas poseen tres características biológicas principales que les hace ser únicos entre el resto de las bacterias y que caracterizan su comportamiento en relación con el hospedador, que son las siguientes:

1. Carencia de pared celular y tamaño más pequeño conocido en un microorganismo de vida libre, tanto en su dimensión celular (0,2-0,8 μm) como en el tamaño del genoma. Así, *M. genitalium* posee el genoma más pequeño (580 kb y sólo 381 genes) contenido en una célula capaz de autorreplicarse y su contenido genómico define el mínimo de genes esenciales para la replicación y reparación del ADN, la transcripción y la translación.

Tabla 1. Especies de *Mollicutes* de origen humano: tipos de mucosas que colonizan, metabolismo y patogenicidad

Especies	Mucosa colonizada		Metabolismo de:			Patogenicidad
	Orofaringe	Tracto genitourinario	Glucosa	Arginina	Urea	
<i>M. pneumoniae</i>	+	-	+	-	-	+
<i>M. salivarium</i>	+	-	-	+	-	-
<i>M. orale</i>	+	-	-	+	-	-
<i>M. buccale</i>	+	-	-	+	-	-
<i>M. faucium</i>	+	-	-	+	-	-
<i>M. lipophilum</i>	+	-	-	+	-	-
<i>M. hominis</i>	+	+	-	+	-	+
<i>M. genitalium</i>	? ^a	+	+	-	-	+
<i>M. fermentans</i>	+	+	+	+	-	+
<i>M. primatum</i>	-	+	-	+	-	-
<i>M. spermatophilum</i>	-	+	-	+	-	-
<i>M. pirum</i>	? ^b	? ^b	+	+	-	-
<i>M. penetrans</i>	-	+	+	+	-	?
<i>Ureaplasma spp.</i>	+	+	-	-	+	+

^a?+: aunque se ha encontrado en la orofaringe, se desconoce su papel en el tracto respiratorio

^b?: desconocida

2. Muy escasa dotación de vías metabólicas. La completa caracterización de los genomas de *M. pneumoniae* y *M. genitalium* ha puesto de manifiesto la ausencia de los genes implicados en la síntesis de aminoácidos y muy pocos genes para la biosíntesis de vitaminas, precursores de ácidos nucleicos, ácidos grasos y colesterol, por lo que son totalmente dependientes de su aporte exógeno, ya sea proveniente de las células del hospedador o bien de los complejos y enriquecidos medios de cultivo.

3. Íntima relación microorganismo-hospedador, como consecuencia de lo anterior, que se manifiesta como parasitismo de superficie con las células de los epitelios y células del sistema inmunitario y como localización intracelular, en algunas especies.

Filogenéticamente se relacionan con un subgrupo de bacterias grampositivas (géneros *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Clostridium* y, principalmente, *Streptococcus*) de las que divergieron hace 600 millones de años mediante un largo proceso de evolución reductiva que llevó a la pérdida de la pared celular y a una marcada reducción gradual del genoma. Se desconoce la naturaleza de la presión selectiva que condujo a tal evolución regresiva.

La carencia de pared celular explica algunas propiedades que les son únicas, tales como la sensibilidad al choque osmótico y a los detergentes, resistencia a los antibióticos β -lactámicos y la gran plasticidad de la célula que da lugar a la formación de las típicas colonias en forma de "huevo frito" por penetración del microorganismo dentro de las trabéculas del agar. Presentan la estructura celular más sencilla, integrada por una membrana plasmática trilaminar, similar a las de las células superiores, un citoplasma con ribosomas y una molécula de ADN de doble cadena circular, densamente empaquetada de aproximadamente 500 megadaltons, por lo que su aspecto es similar al de una célula eucariótica. La membrana plasmática está esencialmente compuesta por proteínas (60-70%) y lípidos (20-30%). Los lípidos (fosfolípidos, glicolípidos y esteroides), dependen de la aportación exógena de ácidos grasos y de colesterol por los tejidos del hospedador y por los medios de cultivo. Las escasas vías metabólicas, están principalmente dedicadas a la generación de energía y en mucho menor grado a proporcionar sustratos para las vías sintéticas. Inteligentemente, compensan la escasez de vías metabólicas mediante la capacidad de sus enzimas para interactuar con numerosos sustratos diferentes.

Todos los *Mollicutes* tienen sistemas respiratorios truncados. Carecen del ciclo del ácido tricarbóxico completo, no tienen quinonas ni citocromos y carecen de la vía de la fosforilización oxidativa para la generación del ATP. De modo, que los mecanismos generadores de energía dan lugar a una muy baja producción de ATP. Por el contrario, producen cantidades relativamente grandes de productos metabólicos finales, cuyos sustratos específicos metabolizados han tomado previamente de los tejidos del hospedador.

Según sus capacidades metabólicas, los micoplasmas se dividen en fermentativos y no fermentativos. Los no fermentativos poseen una arginina dihidrolasa cuya actividad degradante de la arginina va unida a la generación equimolar de ATP por fosforilización a nivel de sustrato, una forma no muy eficaz de producir energía. Los *Mollicutes* del género *Ureaplasma*, no son fermentadores ni poseen la vía de la arginina dihidrolasa pero, en cambio, poseen una potente ureasa y son únicos entre los procariontes por su requerimiento de urea para crecer. La hidrólisis de la urea intracelular y la acumulación resultante de radicales amonio está acoplada a la síntesis de ATP mediante un mecanismo quimiostático.

Los micoplasmas, presentan morfologías variables: esféricas, filamentosas, en forma de pera, y algunas especies patógenas poseen una estructura terminal u "orgánulo para la adherencia". Además, poseen una red de proteínas en la membrana que conforman un citoesqueleto que, además de modular la forma, participa en la división celular por fisión binaria y en la movilidad por desplazamiento (*gliding motility*) de las especies móviles.

La mayoría de los micoplasmas viven en el hospedador como comensales de los epitelios de las mucosas. Las especies que se comportan como patógenas producen infecciones que son generalmente crónicas por naturaleza y rara vez de tipo fulminante. Todas las especies de micoplasmas humanos y animales se adhieren tenazmente a los epitelios de los tractos respiratorio y urogenital, siendo un requisito previo para la colonización y la infección. La adherencia proporciona la oportunidad de lesionar a la célula hospedadora e interferir en su metabolismo. Además, algunas especies son capaces de penetrar en una amplia variedad de células humanas tanto *in vitro* como *in vivo*, con persistencia y supervivencia intracelular prolongadas en la célula hospedadora. Consecuentemente, la localización intracelular protege a los micoplasmas frente a los efectos del sistema inmunitario del hospedador y de los antibióticos, contribuyendo a su difícil erradicación y al establecimiento de infecciones latentes o crónicas.

Aunque las bases moleculares de la patogenicidad de los micoplasmas no son bien conocidas, se han descrito factores de virulencia en casi todas las especies que actúan de forma directa en el proceso patológico, como los que se citan a continuación:

A) Presencia de estructuras especializadas para la adherencia (*M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *M. fermentans* y *M. penetrans*) y la penetración celular. Muestra de la importancia de la adhesión celular para su supervivencia, es el hecho de que a pesar de su drástica economización genética, dediquen un número significativo de genes para las proteínas de la membrana citoplásmica que evolucionarán a adhesinas y a estructuras especializadas para la adherencia.

B) Secreción de enzimas como: fosfolipasas A1, A2 y C por los ureaplasmas (que actúan sobre los fosfolípidos de la placenta, e indirectamente sobre la

síntesis de las prostaglandinas desencadenantes del parto y, por otra parte, alteran la función surfactante del pulmón del feto; secreción de proteasas por ureaplasmas, que escinden la IgA; producción de tirosina fosfatasa, que participa en el proceso de interiorización de *M. fermentans* y también de *M. pneumoniae* en las células del hospedador y la secreción de exonucleasas que permiten al microorganismo el acceso a los nucleótidos de la célula hospedadora en todas las especies (caracterizadas en *M. pneumoniae* y *M. penetrans*).

C) Secreción de H_2O_2 y O_2^- (anión superóxido) por *M. pneumoniae*, responsables de la lesión oxidativa de la membrana de la célula hospedadora.

D) Presencia de fracciones proteicas letales (*M. fermentans*).

E) Secreción por *M. pneumoniae* de una toxina (CARDS TX) que produce los patrones histopatológicos en las células epiteliales.

F) Variaciones antigénicas y de fase. Con el fin de evadir la respuesta inmunitaria del hospedador y pasar desapercibidos, los micoplasmas han desarrollado un sistema altamente eficaz de variación de los principales antígenos y lipoproteínas de la superficie de su membrana, consistente en variaciones de fase y tamaño, que se originan mediante la reordenación de elementos genéticos repetidos en las secuencias del ADN.

G) Efecto inmunomodulador sobre el sistema inmunitario del hospedador. Además de la inducción de una respuesta de anticuerpos específicos, los micoplasmas pueden producir una respuesta inmunitaria lesiva con exacerbación de la enfermedad por su capacidad de estimular (proliferación) o suprimir a varias estirpes de linfocitos de forma policlonal e inespecífica.

H) Inducción de una amplia variedad de citocinas por activación de macrófagos, monocitos, células endoteliales, células epiteliales y otras células, dando lugar a la expresión y secreción de las principales citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-16, IL-18, etc.) así como interferón- γ .

I) Capacidad de penetración intracelular. En la última década ha quedado demostrada la presencia intracelular de organismos de algunas especies (*M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *M. fermentans* y *M. penetrans*) con distribución citoplásmica y en las regiones perinucleares de una amplia gama de tipos de células humanas.

3. INFECCIONES POR *Mycoplasma pneumoniae*

3.1. INFECCIONES RESPIRATORIAS

3.1.1. Introducción. *M. pneumoniae* es la especie humana mejor conocida y más estudiada. Patógeno intracelular facultativo, su genoma consta de sólo 816.394 bp y 687 genes codificadores de proteínas. Genera ATP mediante la fermentación de la glucosa con formación de ácido láctico y ácido acético como productos finales y reduce el tetrazolio.

Las células de *M. pneumoniae* adquieren una forma típica, elongada, con una estructura terminal en punta, u "orgánulo para la adherencia" para la

íntima unión entre el microorganismo y las células del epitelio respiratorio y de otros epitelios de localizaciones extrapulmonares (figura 1).



Figura 1. *Mycoplasma pneumoniae*. Orgánulos para la adherencia. Visualización por microscopía electrónica de barrido. (Tomada de Waites KB, et al. Future Microbiol 2008, con permiso de los autores)

El proceso de evolución reductiva que dio lugar a su mínimo genoma sugiere un comportamiento típico de patógeno intracelular facultativo, que ha sido refrendado en diferentes estudios *in vitro*, aunque no *in vivo*, con la demostración de la invasión, replicación y persistencia intracelular del microorganismo durante largos períodos de tiempo. Igualmente, algunas de las características clínicas de las infecciones por *M. pneumoniae*, como infecciones latentes o crónicas, dificultad en la erradicación del microorganismo y evasión de la respuesta inmunitaria del hospedador, son concordantes con lo que podría esperarse de un patógeno intracelular.

3.1.2. Factores de patogenicidad. Clásicamente, se ha considerado que el curso clínico de la infección por *M. pneumoniae* corresponde más a las respuestas inflamatorias e inmunitarias del hospedador que a los efectos histopatológicos directos causados por el microorganismo, lo cuál es cierto; sin embargo, en la actualidad se conocen varios determinantes de patogenicidad del microorganismo que contribuyen de forma activa a la patogenia de la infección.

La citoadherencia al epitelio ciliado bronquial del hospedador se considera el principal factor de virulencia y el paso esencial para el inicio del proceso infeccioso. Está mediada por el orgánulo de adherencia, complejamente constituido por una proteína de 160-kDa denominada P1, que es la adhesina principal y el componente antigénico mayor, y otras varias adhesinas accesorias denominadas HMW1, -2 y -3, P90, P40, P30, B, C, que actúan coordinadamente entre sí y con la proteína P1 en la formación, ensamblamiento y estabilización del orgánulo. Una vez adherido, *M. pneumoniae* interactúa con varios tipos de receptores de la membrana de la célula

hospedadora, tales como los sialoglicoconjugados, glicoproteínas libres de ácido siálico y glicolípidos sulfatados. También participan en el proceso de adherencia un complejo formado por varias proteínas adicionales (incluidas P-41 y P-24) situadas en la base de la estructura terminal, además de una subpoblación de proteínas citoplásmicas, entre las que se encuentran el factor Tu de elongación y la subunidad β de la piruvato deshidrogenasa, que se trasladan a la superficie de la membrana de *M. pneumoniae* para unirse de forma selectiva a la fibronectina y la mucina de la mucosa respiratoria.

Una vez establecida la íntima unión entre el micoplasma y las células del epitelio, *M. pneumoniae* secreta e introduce en la célula radicales peróxido de hidrógeno y anión superóxido, que se unen a las moléculas endógenas de oxígeno tóxico generadas por la propia célula hospedadora aumentando su concentración. Al mismo tiempo, estos radicales inyectados actúan inhibiendo las enzimas catalasa y superóxido dismutasa de las células del hospedador, reduciendo de esta manera la degradación enzimática de los peróxidos endógenos producidos por la célula y por el micoplasma, contribuyendo a la producción de la lesión oxidativa de los fosfolípidos de la membrana. Igualmente, una cinasa/fosforilasa (HPrK) de *M. pneumoniae*, dependiente del metabolismo del glicerol, parece estar involucrada en la producción de peróxido y en la virulencia. Además, el peróxido de hidrógeno producido por el microorganismo activa también una vía de señales dependiente de una tirosina cinasa que produce una activación aberrante del sistema inmunitario. Las consecuencias del efecto tóxico sobre la membrana de la célula epitelial se manifiestan a las 24 horas mediante ciliostasis, vacuolización, marginación de la cromatina y exfoliación progresivas, que terminan con la descamación celular completa y la pérdida de la integridad del epitelio respiratorio a las 48-72 horas.

Recientemente (2006), se ha identificado y caracterizado en *M. pneumoniae* una toxina ADP ribosilante, denominada "toxina del síndrome de insuficiencia respiratoria adquirido en la comunidad" (CARDS, *Community Acquired Respiratory Distress Syndrome Toxin*) que constituye un factor de virulencia único de este microorganismo. Esta toxina es una proteína de 68 kDa que posee actividad adenosin-difosfato (ADP)-ribosiltransferasa, similar a la de la toxina de *Bordetella pertussis*. Se localiza en la membrana y mayoritariamente en el citoplasma de *M. pneumoniae*. Una vez adherido a la célula del epitelio, la toxina es liberada en las interfases de ambas membranas, donde interacciona con la proteína surfactante A (hSPA), componente de la matriz extracelular de la mucosa respiratoria, y a la que se une específicamente. Esta unión, facilita la introducción de la toxina en el interior de las células diana, dando lugar a la ADP ribosilación de las proteínas, así como a la subsecuente ciliostasis y vacuolización de su citoplasma, marginación de la cromatina y final desestructuración de la integridad del epitelio respiratorio en un período de 48-72

horas, efectos citopáticos totalmente superponibles a los causados por la generación de radicales peróxido y superóxido.

Por otra parte, la toxina tiene un comportamiento altamente inmunogénico, dando lugar a una respuesta de anticuerpos anti toxina-CARDS mucho más potente que la inducida por la proteína P1. También, es potente inductora de citocinas proinflamatorias.

Otro factor de virulencia de *M. pneumoniae* es la recientemente descrita nucleasa citotóxica (Mpn 133) asociada a su membrana, dependiente de Ca^{2+} y que contiene una región rica en serina, lisina y ácido glutámico (región EKS) que es única entre las demás especies de micoplasmas, y que es esencial para su paso a través de las membranas citoplásmica y nuclear de la célula parasitada, así como para su posterior distribución en el citoplasma y regiones perinucleares e intranucleares de las células de las vías aéreas.

Tradicionalmente considerado como un patógeno extracelular, en la última década ha quedado demostrada la presencia intracelular de organismos de *M. pneumoniae* intactos, distribuidos por el todo el citoplasma y en las regiones perinucleares, así como su replicación y supervivencia intracelular durante largos períodos de tiempo (figura 2). Se sugiere que *M. pneumoniae* pueda utilizar su mecanismo de unión a la proteína A surfactante no sólo para introducir la toxina CARDS, sino también para la penetración en el interior de una amplia gama de células y tejidos del hospedador poseedores de los receptores para hSPA, como los macrófagos alveolares, células alveolares de tipo II, glándulas de la submucosa de las vías respiratorias y células epiteliales de localizaciones extrapulmonares. Por medio de esta vía *M. pneumoniae* puede establecer una residencia privilegiada, que podría dar lugar a la diseminación de la infección primaria, o al establecimiento de una enfermedad crónica, situaciones, todas ellas, coincidentes con los cuadros clínicos asociados a la infección por este microorganismo.

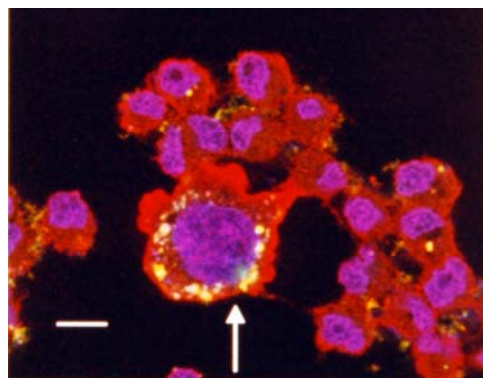


Figura 2. Células de neuroblastoma N2-A. Localización intracitoplásmica de *M. pneumoniae* marcado con FITC (isotiocianato de fluoresceína) a las 48 horas postinfección. Visualización mediante microscopía confocal. Barra = 100 μm . En amarillo, *M. pneumoniae*; en rojo, los citoplasmas celulares y en rosa, los núcleos celulares. (Tomada de Meseguer MA, et al. *Infec Genet Evol* 2003)

3.1.3. Patogenia de la infección. Una vez en el tracto respiratorio, *M. pneumoniae* gracias a su movilidad por deslizamiento, alcanza la base de las células ciliadas a los 2 minutos de la inhalación del aerosol infectado y procede a adherirse, con la consiguiente introducción en la célula epitelial de moléculas de peróxido de hidrógeno, anión superóxido y la toxina CARDS. A continuación, la exposición apical de las células epiteliales y endoteliales al micoplasma, produce la secreción por parte de estas células de moléculas de adhesión intercelular ICAM-1 e ICAM-2, que a su vez provocan el reclutamiento de linfocitos, monocitos, macrófagos y neutrófilos en el punto de la infección. Reclutamiento, al que también contribuye el propio *M. pneumoniae*, mediante quimiotaxis de estas células. De esta manera, se inicia el foco inflamatorio.

Las lipoproteínas de la membrana celular de *M. pneumoniae* activan e inducen de forma directa la producción de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18 e interferón- γ) a partir de los leucocitos de la sangre periférica, células de los epitelios respiratorios, monocitos, macrófagos y de los neumocitos tipo II de los alvéolos pulmonares, que modulan la actividad inflamatoria a nivel local. Este proceso da lugar a un exudado compuesto por neutrófilos y linfocitos activados que proliferan intensamente, dando lugar a la formación de un infiltrado celular inflamatorio local, que en las radiografías de tórax se visualiza como típicos infiltrados pulmonares peribronquiales y perivasculares. Dentro del infiltrado linfocitario, los micoplasmas opsonizados por el complemento y los anticuerpos son posteriormente fagocitados por los macrófagos activados, limitándose el crecimiento del microorganismo.

Las citocinas IL-8 e IL-18 desempeñan un papel crucial en el desarrollo de la neumonía y se relacionan directamente con la gravedad de la enfermedad. La citocina IL-8, funciona como un activador de neutrófilos y la IL-18, funciona como un activador de células T con la consiguiente producción de la cascada de citocinas de los dos tipos de células Th-1 y Th-2. El predominio de una respuesta inflamatoria del tipo Th-2 y sus citocinas correspondientes (IL-4, IL-5) en las vías respiratorias puede contribuir a la patogénesis y reactivación del asma o al mantenimiento de una inflamación e hiperreactividad crónica de las vías respiratorias.

La producción local de citocinas y la activación de los linfocitos proliferados en el punto de la infección puede tanto minimizar la enfermedad, ya que la infiltración celular inflamatoria actúa como una barrera limitante que impide la diseminación del microorganismo fuera del tracto respiratorio, como exacerbar la enfermedad a través del desarrollo de una hipersensibilidad inmunológica, con aumento de la lesión del epitelio respiratorio y de la inflamación. Es decir, la neumonía es la consecuencia de la respuesta inmunitaria local y limitante del hospedador, de modo que cuanto mayor sea la respuesta inmunitaria celular y la producción de

citocinas, mayores serán la lesión pulmonar y la gravedad del cuadro clínico. En el hospedador inmunocompetente, se produce, además, una respuesta inmunitaria con formación de anticuerpos específicos de duración limitada, por lo que las reinfecciones son frecuentes y el microorganismo, a veces, persiste, convirtiendo a los pacientes en portadores a largo plazo.

3.1.4. Epidemiología. La infección por *M. pneumoniae* puede afectar a los tractos respiratorios superior e inferior. La distribución de la infección es mundial y se produce en personas de todas las edades. La transmisión del microorganismo a través de aerosoles, requiere un contacto muy próximo entre las personas y se ve facilitado por la tos persistente y el largo período de incubación después de la exposición (2 a 3 semanas). La infección es endémica todo el año, pero aumenta durante la primavera y en el paso del otoño al invierno, con producción de epidemias cíclicas cada 3 a 5 años que, a su vez, tienen un período de duración de 1 ó 2 años. La diseminación del microorganismo entre los miembros de una familia se realiza de forma gradual, con una tasa de ataque del 30%, siendo muchos de ellos asintomáticos. Es frecuente la aparición de brotes de infección respiratoria en instituciones cerradas o semicerradas, instalaciones militares, comunidades religiosas y colegios, donde la tasa de ataque del micoplasma es más elevada (25-71%) que en el núcleo familiar.

M. pneumoniae es uno de los agentes etiológicos de la neumonía adquirida en la comunidad (NAC) en personas de todas las edades, con gravedad clínica variable. No presenta diferencias significativas en las tasas de infección en niños, adultos y personas de edad avanzada (15-30%). Sin embargo, debido a los numerosos casos de NAC que se tratan de forma ambulatoria, es muy probable que la incidencia de neumonías por *M. pneumoniae* esté infraestimada.

Atendiendo a la incidencia de la infección respiratoria por *M. pneumoniae* por grupos de edad, en el subgrupo de los niños, la incidencia más baja se da en los niños menores de 1 año y la más alta en los preescolares de edades comprendidas entre los 3 y los 5 años, seguida por la incidencia en los escolares entre los 6 y 12 años. En el subgrupo de los individuos adultos, la incidencia es significativamente mayor ($p < 0,001$) en los mayores de 70 años que en los otros subgrupos de edad. Es interesante destacar que la prevalencia de neumonía por *M. pneumoniae* en los ancianos hospitalizados es la segunda detrás de *Streptococcus pneumoniae*.

La inmunidad producida por la infección no es duradera y las reinfecciones a lo largo de la vida no son infrecuentes. Los aislados de *M. pneumoniae* se pueden agrupar en dos subtipos, P1 y P2, basados en 2 grupos genómicos de la adhesina P1, que corresponden a diferencias en las secuencias de aminoácidos y nucleótidos. Ya que los dos subtipos parecen alternar en las sucesivas epidemias de la infección por *M. pneumoniae*, la variación en la adhesina P1 podría estar asociada con el desarrollo de anticuerpos específicos de corta duración frente a

un subtipo determinado y a las reinfecciones frecuentes con el otro subtipo alternante.

M. pneumoniae, puede persistir durante períodos de tiempo variable en el tracto respiratorio de pacientes clínicamente recuperados de la infección tras un tratamiento adecuado, que quedan como reservorio a partir del cual puede diseminarse la infección.

3.1.5. Manifestaciones clínicas. La infección por *M. pneumoniae* se puede manifestar en el tracto respiratorio superior, en el inferior o en ambos. La afectación de ambos tractos puede presentarse de forma simultánea o bien secuencial. La infección respiratoria típica causada por *M. pneumoniae* consiste en un síndrome de desarrollo lento y gradual consistente en faringitis, ocasionales otitis media y miringitis bullosa y, eventualmente, afectación prolongada del tracto respiratorio inferior, que puede progresar a neumonía primaria atípica, con fiebre e infiltrados pulmonares en ambas bases.

En un 50% de los casos, la infección por *M. pneumoniae* se manifiesta sólo en el tracto respiratorio superior y puede ser asintomática en un 20% de los individuos, incluso con detección por PCR del microorganismo en los pulmones, situación que suele darse especialmente en los pacientes con asma subyacente.

Las manifestaciones clínicas de la infección respiratoria por *M. pneumoniae* no presentan signos o síntomas específicos que los diferencien de las infecciones causadas por virus u otras bacterias causantes de NAC, en particular *Chlamydia pneumoniae*. Las manifestaciones más frecuentes incluyen dolor de garganta, ronquera, fiebre, tos inicialmente seca pero que puede volverse productiva al cabo de varios días, cefalea, escalofríos, rinorrea, mialgias, otalgia y malestar general. La tos, el síntoma más frecuente y con frecuencia muy persistente, representa la manifestación de la traqueobronquitis, que es la forma clínica más frecuente de la infección. En los estadios iniciales va asociada con congestión de las vías respiratorias superiores, síntomas gripales y faringitis.

La neumonía, sólo se produce en el 3-10% de los individuos infectados. Cursa con fiebre de mayor grado, tos de tipo "tosferinoide" y disnea (en los casos más graves). Al inicio de la neumonía puede no haber ningún hallazgo en la auscultación. Más tarde, pueden escucharse algunos estertores, sibilancias expiratorias o ambos. No suele haber signos de consolidación al quedar los alvéolos libres. La radiografía de tórax suele establecer el diagnóstico mediante la presencia de infiltrados peribronquiales en uno o más lóbulos, que corresponden a la reacción inflamatoria local con acúmulos linfocitarios. En los casos no complicados, el curso de la enfermedad es de carácter benigno ("neumonía ambulatoria"), la fiebre dura una semana, mientras que la tos y la astenia persisten durante dos semanas o más. El tratamiento antibiótico, generalmente, acorta la duración de los

síntomas. Muy infrecuentemente puede complicarse con empiema.

En los niños muy pequeños, la infección por *M. pneumoniae* puede causar hasta un 5% de casos de bronquiolitis; por debajo de los 5 años de edad, suele manifestarse con rinitis y jadeo, mientras que la progresión a neumonía es relativamente infrecuente. En los niños entre 5 y 15 años de edad lo más frecuente es el desarrollo de bronconeumonía con afectación de uno o más lóbulos, que en ocasiones requiere hospitalización. En los adultos, son más frecuentes las infecciones leves o asintomáticas y la bronconeumonía con afectación de uno o más lóbulos (3-10% de los infectados).

Sólo un 5% de los adultos con neumonía por *M. pneumoniae* requiere hospitalización. Por el contrario, la neumonía por *M. pneumoniae* en las personas de edad avanzada suele ser grave requiriendo hospitalización. En muy raras ocasiones, la infección se puede presentar en individuos, por otra parte sanos, como un cuadro fulminante con afectación multiorgánica y curso fatal.

3.2. MANIFESTACIONES EXTRAPULMONARES

Entre el 7-25% de las personas infectadas por *M. pneumoniae* pueden presentar complicaciones extrapulmonares. Éstas pueden aparecer antes, durante o después del cuadro respiratorio o, incluso, no encontrarse antecedente respiratorio alguno, pudiendo afectar a la gran mayoría de los órganos del cuerpo. Con frecuencia, algunas manifestaciones tienen relevancia clínica y una gravedad mayor que el cuadro respiratorio. En general, los síndromes neurológicos son autolimitados y de buen pronóstico, aunque puede haber secuelas permanentes en el 30% de los casos.

3.2.1. Patogenia. El mecanismo de producción no es bien conocido. Durante mucho tiempo se ha sugerido que las reacciones autoinmunes eran las responsables de muchas de las complicaciones extrapulmonares. Sin embargo, la documentación de la presencia de *M. pneumoniae*, mediante cultivo y aislamiento y/o detección por PCR, en muestras de sangre, líquido sinovial, líquido pericárdico, líquido cefalorraquídeo y vesículas cutáneas, pone de manifiesto la diseminación bacteriémica del microorganismo y la invasión directa de órganos y tejidos.

Recientemente, atendiendo al mecanismo de producción a nivel del tejido/órgano diana, se ha propuesto la clasificación de las manifestaciones extrapulmonares en tres categorías:

1) **Manifestaciones de tipo directo:** las lipoproteínas de la membrana celular de *M. pneumoniae*, diseminado por micoplasmemia a cualquier órgano distante, inducen la producción local de citocinas inflamatorias causantes del proceso inflamatorio en el tejido diana. *M. pneumoniae* puede pasar a la circulación sanguínea o linfática a través de las fisuras producidas por el TNF- α en las uniones laterales de las células dañadas del epitelio respiratorio.

2) **Manifestaciones de tipo indirecto:** causadas por modulación inmunitaria, principalmente por una reacción de autoinmunidad producida por reacciones cruzadas entre los componentes de la célula bacteriana (glicoproteínas y glicolípidos) y los de las células humanas. También por formación de complejos inmunes.

3) **Manifestaciones causadas por alteraciones vasculares:** de tipo oclusión vascular. *M. pneumoniae* induce vasculitis o trombosis, o ambas, con o sin estado de hipercoagulabilidad sistémica, que dan lugar al proceso patológico en el tejido diana. En esta categoría pueden intervenir los dos mecanismos anteriores, directo e indirecto; el *M. pneumoniae*, diseminado hematógicamente puede afectar localmente a la pared vascular por inducción de citocinas (TNF- α) y quimiocinas (IL-8), que causan vasculitis local y/o oclusión vascular trombótica sin estado de hipercoagulabilidad sistémica (tipo directo). Alternativamente, se puede producir una oclusión vascular trombótica generalizada como resultado de un estado de hipercoagulabilidad sistémica, producido a través de la activación de mediadores tales como el complemento y un dímero-D de la fibrina (tipo indirecto).

Estos tres tipos de mecanismos no son excluyentes entre sí, pudiéndose dar los tres simultáneamente en el mismo órgano.

Un aspecto importante, es el hecho de que la bacteriemia por *M. pneumoniae* (prerrequisito para el mecanismo de tipo directo) se produce con mayor frecuencia en ausencia de neumonía, lo que refuerza el papel de barrera de los infiltrados pulmonares.

3.2.2. Manifestaciones clínicas

Manifestaciones neurológicas:

Son las manifestaciones extrapulmonares más frecuentes y más graves de la infección por *M. pneumoniae*. Alrededor del 7% de los pacientes hospitalizados con neumonía por *M. pneumoniae*, presentan complicaciones neurológicas de gravedad variable. La mayoría, aparecen 1 ó 2 semanas después del comienzo del cuadro respiratorio, que no siempre corresponde a una neumonía, y el 20% o más de los pacientes no presentan un diagnóstico previo de infección respiratoria.

Según su localización anatómica se clasifican en: las que afectan al cerebro, alteraciones de la médula espinal y alteraciones de los nervios periféricos.

Manifestaciones neurológicas que afectan al cerebro:

Encefalitis. La encefalitis por *M. pneumoniae* es más frecuente en los niños que en los adultos y no suele acompañarse de síntomas respiratorios. Estudios a larga escala han demostrado que constituye la causa más frecuente de encefalitis pediátrica.

El mecanismo patogénico debe ser multifactorial y en relación a éste, las encefalitis por *M. pneumoniae* pueden clasificarse en encefalitis de comienzo precoz (dentro de los 7 días del inicio de la fiebre) y de comienzo tardío (después de los 8 días). En la encefalitis de comienzo precoz se ha

detectado (por PCR) con mayor frecuencia el genoma de *M. pneumoniae* en el LCR, lo que sugiere un mecanismo de tipo directo, mientras que en las de comienzo tardío el mecanismo es de tipo indirecto, por autoinmunidad. En la encefalitis de comienzo precoz, se encuentran significativamente elevadas en el LCR las citocinas IL-8 e IL-18, importantes mediadores de la inflamación de producción intratecal, mientras que en la de comienzo tardío sólo se eleva la IL-8. En cuanto al mecanismo de autoinmunidad, en la encefalitis de comienzo tardío se han documentado anticuerpos anti-gangliósido, así como la síntesis intratecal de anticuerpos específicos frente a *M. pneumoniae* sin disrupción de la barrera hematoencefálica. Igualmente se han invocado los mecanismos de tipo directo y la lesión vascular para explicar la implicación de *M. pneumoniae* en cuadros de encefalomiелitis aguda diseminada.

Necrosis bilateral del núcleo estriado y encefalopatía necrosante. En estas afecciones del sistema nervioso central, se ha detectado el genoma de *M. pneumoniae* en el LCR, así como lesión vascular local, por lo que es posible que el microorganismo cause el daño vascular por medio de la inducción de citocinas y quimiocinas que, posteriormente, conducen a la oclusión vascular.

Ictus/accidente cerebrovascular. Se ha aislado *M. pneumoniae* y detectado su genoma en el LCR de pacientes, adultos y niños, con este cuadro, por lo que se sugiere que *M. pneumoniae* causaría la lesión vascular local que llevaría a la oclusión en ausencia de un estado de hipercoagulabilidad sistémica.

Alteraciones de la médula espinal:

Mielitis transversa. Manifestación extrapulmonar relativamente frecuente, en la que al igual que en las entidades anteriormente descritas se ha detectado el genoma de *M. pneumoniae* en el LCR, sugiriéndose la hipótesis de una oclusión vascular. Se ha propuesto un mecanismo de tipo directo en las de comienzo precoz y un mecanismo de tipo indirecto en las de comienzo tardío.

Síndrome de Guillain-Barré. Es bien conocida la asociación de este síndrome con la infección por *M. pneumoniae*, de manera que este microorganismo es el segundo agente causal (15%) de este síndrome, después de *Campylobacter jejuni* (26%). Generalmente reconocido como alteración inmunológica, implica la producción de lesiones extensas de la médula espinal y de los nervios periféricos. El mecanismo patogénico consiste en un proceso de desmielinización autoinmune desencadenado por el microorganismo y mediado por la producción de autoanticuerpos frente al galactocerebrósido (Gal-C) y al gangliósido (GM1), antígenos principales de la mielina, que, a su vez, también forman parte de los glicolípidos de la membrana de *M. pneumoniae*. No obstante, también se ha documentado el aislamiento de *M. pneumoniae* en el LCR de un paciente con este síndrome.

Meningitis. *M. pneumoniae* se ha aislado y detectado por PCR a partir del LCR de pacientes con meningitis aséptica. Igualmente, se han encontrado concentraciones elevadas de IL-8 e IL-18 en el LCR, por lo que se piensa que corresponde a una manifestación extrapulmonar de tipo directo producida por una micoplasmemia previa.

Alteraciones en los nervios periféricos:

En el curso de la infección por *M. pneumoniae*, se han comunicado neuropatías periféricas y radiculopatías varias como la afectación de los nervios craneales, incluida la afectación del octavo par craneal con pérdida brusca de la audición, la parálisis de los abductores, neuritis óptica, neuropatía del plexo braquial y parálisis de los nervios frénico y recurrente. Se desconoce el mecanismo patogénico, aunque lo más probable es que sea inmunológico.

Manifestaciones cardiovasculares:

Infrecuentes (1-8,5%), incluyen pericarditis, derrame pericárdico con o sin taponamiento cardíaco, endocarditis, miocarditis, alteraciones de la conducción y la enfermedad de Kawasaki, relativamente frecuente en los países asiáticos (Japón, Tailandia) y muy infrecuente en los países occidentales.

En la pericarditis, con frecuencia se puede aislar o detectar (PCR) *M. pneumoniae* en el líquido o tejido pericárdico. En la endocarditis, se ha aislado *M. pneumoniae* a partir de la sangre, lo que sugiere que en ambas manifestaciones el mecanismo patogénico es de tipo directo, a través de una bacteriemia.

La enfermedad de Kawasaki como manifestación de la infección por *M. pneumoniae* se suele asociar a neumonía y a disfunción hepática y aunque no se conoce bien el mecanismo de patogenicidad, se sugiere que sea del tipo indirecto, causado por modulación inmunitaria.

Manifestaciones dermatológicas:

Constituyen las manifestaciones extrapulmonares más frecuentes (hasta en el 25% de los pacientes) de la infección por *M. pneumoniae*. Comprenden exantemas leves (maculopapulares, vesiculares, petequiales, urticariformes) autolimitantes y exantemas graves (eritema exudativo multiforme, síndrome de Stevens-Johnson y síndrome de Lyell).

El síndrome de Stevens-Johnson se considera manifestación de tipo directo, ya que *M. pneumoniae* ha sido aislado a partir de las vesículas bullosas. Por el contrario, el eritema multiforme, la urticaria y la púrpura anafilactoide podrían corresponder a manifestaciones extrapulmonares de tipo indirecto, con un mecanismo de patogenicidad que implica mecanismos inmunológicos como la alergia o la autoinmunidad.

Manifestaciones hematológicas:

La producción de anemia sin significación clínica y la inducción de crioaglutininas son fenómenos frecuentes (50%) durante el curso de la infección, sin embargo la anemia hemolítica autoinmune, que es la manifestación extrapulmonar de tipo indirecto más conocida de la infección por *M. pneumoniae*, es tan

infrecuente como grave. El mecanismo de producción establecido consiste en la producción de anticuerpos IgM que reaccionan frente a los antígenos li de los glicolípidicos de la superficie de los eritrocitos y de *M. pneumoniae*. También se sugiere que el antígeno eritrocitario actúe como un receptor de superficie para el microorganismo, produciendo directamente la hemólisis.

La coagulación intravascular diseminada, es una manifestación esporádica y con frecuencia fatal, representativa del tipo de complicación de tipo indirecto por oclusión vascular con estado de hipercoagulabilidad sistémica. Se debe a una alteración inmunitaria que conduce a la activación de los mediadores químicos y a la inducción de la actividad procoagulante.

Manifestaciones musculoesqueléticas:

Es clásica la descripción de artritis, sin neumonía, en pacientes con deficiencias primarias de inmunoglobulinas o en tratamiento con terapia inmunosupresora, en los que se ha aislado o detectado *M. pneumoniae* en el líquido sinovial. También, se presenta en individuos inmunocompetentes y no es infrecuente en lactantes y niños pequeños. Se especula que su mecanismo de producción sea de tipo directo, por diseminación hematógena y producción de inflamación local por las abundantes células productoras de citocinas que se encuentran en el tejido sinovial.

Manifestaciones renales:

Aunque muy infrecuentes, se han descrito casos de glomerulonefritis aguda, fracaso renal y nefritis tubulointersticial. El mecanismo de producción es de tipo indirecto, apelándose a la capacidad de *M. pneumoniae* para formar complejos inmunes circulantes.

3.3. PAPEL DE *Mycoplasma pneumoniae* EN OTRAS ENTIDADES CLÍNICAS

Enfermedad pulmonar crónica y asma. *M. pneumoniae*, al igual que otras especies de micoplasmas que infectan animales, tiene la capacidad de inducir estados de enfermedad crónica en los que la eliminación del microorganismo es extremadamente difícil debido a su localización intracelular, efectos inmunomoduladores y variaciones de los antígenos de superficie.

Se sospecha que *M. pneumoniae* pueda jugar un papel en algunas enfermedades crónicas como la artritis reumatoide del adulto, la artritis idiopática juvenil, la enfermedad de Crohn y el asma.

Asma. *M. pneumoniae* aparece implicado tanto en la patogenia como en la exacerbación de los ataques agudos. Evidencias que lo apoyan son el mayor aislamiento del microorganismo de individuos asmáticos que de los sanos, la buena respuesta de la función pulmonar en los asmáticos con infección demostrada por *M. pneumoniae* al tratamiento con macrólidos, y la inducción por *M. pneumoniae* de mediadores inflamatorios implicados en la patogenia del asma como la IgE, la IL-4, la substancia P, neuroquinina, e IL-5, que pueden jugar un papel en las exacerbaciones y en el jadeo. Además, la

infección crónica por *M. pneumoniae* en modelos de ratas ha demostrado la producción de neumonía, la estimulación de la producción de citocinas, hiperreactividad de las vías aéreas y un proceso inflamatorio predominantemente de tipo Th2.

Alteraciones del sistema inmunitario. Los pacientes con hipogammaglobulinemia, especialmente los niños, presentan un mayor riesgo de padecer episodios repetidos o infecciones respiratorias crónicas por *M. pneumoniae* acompañadas de artritis. En ausencia de inmunidad humoral protectora frente al microorganismo, se produce diseminación de la infección a otros lugares extrapulmonares, especialmente las articulaciones, de las que se ha aislado el microorganismo.

Igualmente, los niños con asplenia funcional, alteración del sistema inmunitario por drepanocitosis, los niños con diferentes tipos de condiciones inmunosupresoras y los niños con síndrome de Down, presentan un riesgo mayor de infectarse con *M. pneumoniae* y desarrollar cuadros de neumonía fulminante.

4. INFECCIONES POR MICOPLASMAS UROGENITALES

4.1. INTRODUCCIÓN

El grupo de microorganismos denominados "micoplasmas genitales", por su localización en las mucosas del tracto urogenital, incluye las especies, *M. hominis*, *Ureaplasma* spp. (con sus dos biovariedades: *U. parvum* y *U. urealyticum*) y *M. genitalium*. Otras especies que también se localizan en el tracto urogenital son *M. penetrans*, *M. spermatophilum* y *M. fermentans*.

Todos estos micoplasmas, pueden colonizar con mayor o menor frecuencia el tracto genitourinario de las personas sanas, sexualmente activas. Sin embargo, *M. hominis*, *Ureaplasma* spp. y *M. genitalium* se han asociado definitivamente con enfermedad y potencial implicación en la patología del tracto urogenital de los adultos, del embarazo, del parto, del feto y del neonato. Existe abundancia de datos sobre el papel patógeno de algunas de estas especies en determinados cuadros infecciosos.

Mientras que *M. genitalium* es un patógeno reconocido de transmisión sexual en varones y mujeres, *M. spermatophilum*, especie muy infrecuente, no parece presentar ninguna implicación clínica. Ambas especies tienen un comportamiento extremadamente fastidioso en los cultivos, por lo que su detección se realiza sólo mediante técnicas de amplificación de ácidos nucleicos.

M. penetrans, especie capaz de invadir activamente diversos tipos de células, presenta una estricta asociación con individuos infectados por el VIH y aunque en la actualidad se desconoce el tipo de implicación clínica, se sugiere un papel de cofactor en la progresión de la enfermedad por su contribución en el deterioro del sistema inmunitario.

M. fermentans, especie directamente relacionada con el SIDA y localizada en los órganos sólidos de estos pacientes, se ha detectado, con relativa frecuencia, por PCR en el tracto urogenital de

individuos sanos y, más raramente, en líquido amniótico y en asociación con corioamnionitis. Sin embargo, su significación clínica no está clara y no se reconoce como patógeno del tracto urogenital.

M. hominis y *Ureaplasma* spp. son las especies que con mayor frecuencia colonizan el tracto urogenital humano pudiendo ser aisladas de hombres y mujeres asintomáticos. La colonización por *Ureaplasma* spp. en el varón oscila entre el 3-56%, y por *M. hominis* entre el 0-13 %; mientras que en la mujer, la colonización por *Ureaplasma* spp. oscila entre el 8,5-77% (siendo especialmente elevada durante el embarazo) y del 0-31% por *M. hominis*.

El porcentaje de colonización en ambos sexos se relaciona con la actividad sexual, edad, y nivel socioeconómico. Partiendo de estos datos, es evidente que estos microorganismos tienen una prevalencia elevada, particularmente en la mujer. Por otra parte, hay que tener en cuenta que en muchas circunstancias clínicas el uso de antibióticos activos frente a otros microorganismos patógenos (penicilinas, cefalosporinas), e inactivos frente a micoplasmas, pueden seleccionar a estos microorganismos y favorecer un recuento de colonias más elevado, sin que ello implique un papel como causantes de la enfermedad.

Obviamente, la colonización del tracto urogenital por *M. hominis* y *Ureaplasma* spp. plantea dificultades en la valoración de su aislamiento a partir de muestras procedentes del tracto genitourinario inferior, siendo necesario el empleo de métodos de cultivo cuantitativos y el establecimiento de puntos de corte que permitan diferenciar colonización de infección, así como procedimientos de obtención de las muestras que eviten el paso a través de tramos colonizados.

4.2. FACTORES DE PATOGENICIDAD

La mayoría de las infecciones por micoplasmas se limitan a las superficies mucosas, donde se encuentran en estrecha relación y adheridos a las células epiteliales del hospedador. Algunas especies, particularmente *M. fermentans*, *M. penetrans* y *M. genitalium*, invaden las células del hospedador y los microorganismos residen intracelularmente. Raramente se diseminan, a menos que exista una alteración de las defensas del hospedador, como sucede durante el desarrollo del feto y el recién nacido pretérmino. Algunas especies como *M. genitalium* y *M. penetrans* poseen orgánulos para la adherencia especiales que facilitan la citoadherencia y la penetración celular, mientras que las proteínas de citoadherencia de *M. hominis* y *Ureaplasma* spp. no están organizadas en orgánulos específicos. En *M. hominis* se han descrito proteínas de citoadherencia que incluyen dos polipéptidos de superficie, P50 y P100 que favorecen la adherencia a las células eucariotas. También posee otra proteína superficial, llamada antígeno variable asociado a la adherencia (Vaa), que favorece la diseminación de una célula a otra y es altamente inmunogénica. Por su parte, *Ureaplasma* spp. tiene un antígeno de múltiples bandas (MB), que es

inmunogénico, presenta una elevada variabilidad *in vitro*, y puede estar relacionado con la respuesta inflamatoria del hospedador. Las variaciones en el antígeno MB se han utilizado en la separación de las dos especies de *Ureaplasma* spp.

Ambas especies, producen varios factores de virulencia. Los productos finales del metabolismo como el amoníaco, resultante del metabolismo de la arginina por *M. hominis* y la urea por *Ureaplasma* spp., pueden producir toxicidad local. Por otra parte, la actividad de la ureasa de *Ureaplasma* spp. se ha relacionado con la producción de cálculos urinarios. Las enzimas fosfolipasas A1, A2, y C de la membrana plasmática de *Ureaplasma* spp. hidrolizan los fosfolípidos de la placenta, con liberación de ácido araquidónico, y la consiguiente producción de prostaglandinas desencadenantes del parto, así como por alteración de la función surfactante del pulmón del feto. También se ha demostrado la producción de citocinas inflamatorias como factor de necrosis tumoral (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6). La liberación de estas sustancias contribuye a la respuesta inflamatoria y a cambios patológicos en diversas situaciones clínicas. Tanto *M. hominis* como *U. urealyticum*, pueden producir proteasas activas frente a la IgA lo que facilita la invasión de las mucosas.

4.3. INFECCIÓN GENITOURINARIA

4.3.1 Uretritis no gonocócica (UNG). Aunque se ha vinculado *U. urealyticum* a la UNG no está claro qué porcentaje de infecciones corresponde, en el hombre, a este microorganismo. En un estudio realizado por Horner y cols. *U. urealyticum* solamente se asoció a la UNG crónica (UNGC), que aparece postratamiento. La detección de un recuento inferior a 10^4 UFC/ml en la uretra masculina no es significativa de infección.

Desde la identificación de las dos biovariedades de *Ureaplasma* spp., la biovariedad 2, *U. urealyticum*, ha sido relacionada con la UNG, en contraste con la biovariedad 1, *U. parvum*, que no ha sido relacionada. *Ureaplasma* spp. también se relaciona con una pequeña proporción de casos de prostatitis crónica y como causa rara de epididimitis.

M. genitalium, presenta una fuerte asociación con la UNG aguda, persistente tras el tratamiento y recurrente, tanto en varones como en mujeres. La prevalencia es variable según la población estudiada, con rangos que oscilan entre el 8% y el 29% en varones diagnosticados de UNG y un 4,5% en mujeres con signos de inflamación uretral. En un estudio reciente en pacientes con UNG, *M. genitalium* se asoció significativamente con uretritis sintomática y se detectó en el 10% de los pacientes. Igualmente, *M. genitalium* presenta una asociación significativa con balanitis y/o postitis. Es interesante reseñar la alta prevalencia de *M. genitalium* en la uretra de varones pertenecientes a grupos específicos de población, como homosexuales e individuos VIH positivos. Ni *M. fermentans*, ni *M. penetrans* se han detectado en la uretra de hombres con uretritis.

4.3.2 Vaginosis bacteriana (VB). La VB, es una entidad microbiológica en la que la microbiota vaginal normal se encuentra alterada en su composición, con pérdida de los componentes principales, *Lactoacillus* spp., y reemplazamiento por otras bacterias como *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* spp., anaerobios, *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma* spp.

La VB tiene una incidencia del 20% en las mujeres sanas, embarazadas y no embarazadas. Se ha demostrado, que las mujeres embarazadas con VB tienen una probabilidad significativamente mayor de presentar aborto o parto pretérmino y que la presencia de VB se asocia con el aislamiento del microorganismo de las membranas de la placenta.

La colonización por *M. hominis* en la VB, alcanza recuentos de hasta 10.000 veces mayores que en mujeres sin VB y algunos autores consideran que después de las 24 semanas de gestación, la colonización por *M. hominis* constituye un factor de riesgo del parto pretérmino. Es probable, que *M. hominis* encuentre unas condiciones adecuadas para su crecimiento en el medio creado por otras bacterias, y que cuando estas últimas sean erradicadas, él también lo sea. En consecuencia, es difícil saber si es un patógeno *per se*, si necesita de las bacterias de la VB para serlo, si es co-factor de la VB o, simplemente, un acompañante. Si *M. hominis* contribuye de forma importante en los desenlaces adversos del embarazo, es probable que sea a través de su implicación en la VB.

4.3.3. Cervicitis. La cervicitis, caracterizada por la inflamación del cérvix, se asocia a enfermedades de transmisión sexual. *M. genitalium* se asocia significativamente con la cervicitis, habiendo sido detectada por PCR en el 28% de las mujeres con este diagnóstico. Aunque son frecuentes las coinfecciones, en un análisis de regresión logística, la colonización con *M. genitalium* únicamente se asoció significativamente a cervicitis.

4.3.4. Enfermedad inflamatoria pélvica (EIP). La EIP es una enfermedad de etiología multifactorial, que aparece como resultado de una infección por varias bacterias, como *Chlamydia trachomatis* y en menor grado *Neisseria gonorrhoeae*. Existen estudios que relacionan a *M. hominis* y sobre todo a *M. genitalium* con el desarrollo de EIP. De las biovariedades de *Ureaplasma* spp. aisladas en las muestras clínicas, la biovariedad *urealyticum* se encuentra más frecuentemente en pacientes con EIP y en casos de aborto espontáneo.

4.3.5. Infección urinaria y litiasis. La infección urinaria por ureaplasmas ha sido evaluada principalmente en la mujer embarazada y su aislamiento en el primer trimestre del embarazo se ha relacionado con el desarrollo de preeclampsia en el tercer trimestre. Algunos autores han obtenido hasta un 48% de cultivos positivos para micoplasmas (con predominio de *Ureaplasma* spp.) en mujeres con síntomas crónicos de infección urinaria, una vez excluidos los agentes etiológicos más frecuentes. Igualmente, *Ureaplasma* spp. y *M. hominis* participan en la pielonefritis crónica de reflujo con un 7% y 9%,

respectivamente, de aislamientos a partir de orinas obtenidas por punción suprapúbica.

La ureasa de *Ureaplasma* spp. induce la cristalización de fosfato de estruvita y calcio en la orina, *in vitro* y en modelos animales. Además estos microorganismos se han aislado en cálculos renales de pacientes.

4.4. INFECCIÓN MATERNO-FETAL

Ambas especies, *M. hominis* y *Ureaplasma* spp., pueden infectar el producto de la concepción, pero de forma predominante, *Ureaplasma* spp. es la más frecuente y más virulenta de las dos especies.

4.4.1. Corioamnionitis (CA), aborto espontáneo (AE) y parto pretérmino (PP). La CA es una complicación frecuente del embarazo, asociada a patología materna, fetal, perinatal y a largo plazo. Las complicaciones maternas incluyen aborto y parto pretérmino; las fetales, sepsis neonatal, enfermedad pulmonar crónica y lesión cerebral del recién nacido.

La CA o infección intra-amniótica es una infección de las membranas y el corion de la placenta, que se adquiere en general por vía ascendente en el marco de la rotura prematura de membranas (RPM). Puede aparecer con las membranas intactas, y esto es más frecuente en el caso de infección por micoplasmas genitales. La definición de CA depende de los criterios diagnósticos, que pueden ser clínicos, microbiológicos o histopatológicos. Está presente en 40-70% de los nacimientos pretérmino con RPM o parto espontáneo y en 1-13% de los nacimientos a término. Sin embargo, se admite que en la mayoría de los casos la infección intrauterina, es una infección clínicamente silenciosa.

La patogénesis de la CA depende del paso de los microorganismos al corioamnios o cordón umbilical de la placenta. En la figura 3, se representan las vías de acceso de los microorganismos en el desarrollo de la corioamnionitis.

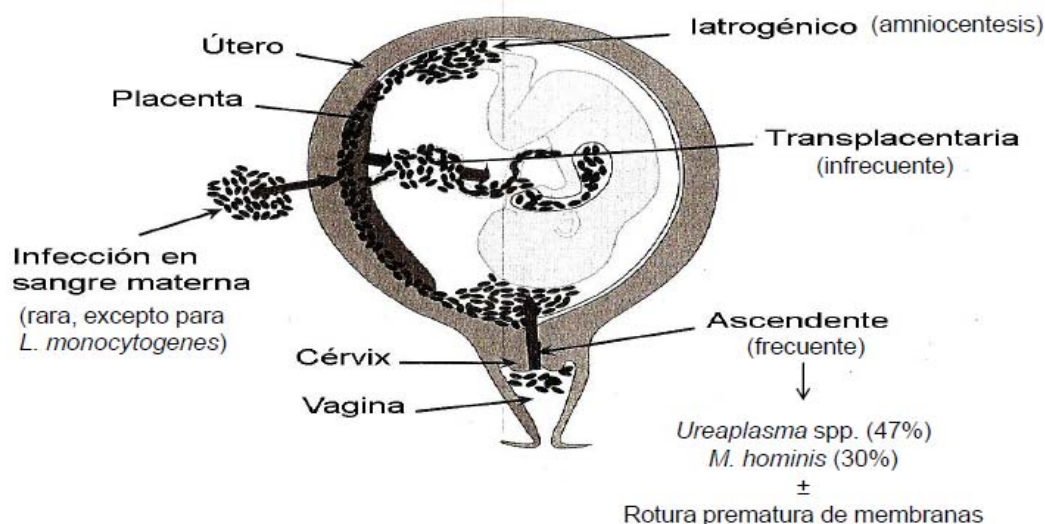


Figura 3. Vías de acceso de los microorganismos al corioamnios. (Modificado de Tita ATN, Andrews WW, 2010)

Los mecanismos por los que la infección intrauterina inducen el parto pretérmino están relacionados con la activación del sistema inmune innato. Los microorganismos son reconocidos por unos receptores de reconocimiento del patrón molecular (receptores Toll-like), que a su vez inducen la producción de quimiocinas inflamatorias y citocinas en los compartimientos materno y fetal. Esta respuesta inflamatoria determina la liberación de prostaglandinas en el amnios, corión y decidua, que producen contracciones uterinas, maduración y dilatación del cuello uterino, lesión de las membranas y parto a término o nacimiento pretérmino. En el feto, además del riesgo directo de infección y sepsis, la respuesta inflamatoria produce lesión de la sustancia blanca cerebral, que puede causar parálisis cerebral y otras alteraciones neurológicas.

La corioamnionitis es una infección polimicrobiana, en general adquirida por vía genital ascendente a partir de la vagina, y en más del 65 % de los cultivos

de líquido amniótico (LA) positivos, se aíslan 2 o más microorganismos. En los casos de CA con cultivo positivo, los micoplasmas genitales, *M. hominis* y, especialmente, *Ureaplasma* spp. son los microorganismos aislados con mayor frecuencia, 30% y 47%, respectivamente. El aislamiento de *Ureaplasma* spp. en el corioamnios se asocia a CA histológica y está inversamente relacionado con el peso del feto al nacer. *M. hominis*, más raramente invade el corioamnios. El hallazgo de *Ureaplasma* spp. en el LA tiene mayor significado que su hallazgo en muestras de vagina o cérvix. La detección de *Ureaplasma* spp. mediante PCR en el LA durante el segundo trimestre de embarazo, se relaciona con el desarrollo precoz del trabajo de parto y parto pretérmino, obteniéndose un cultivo positivo sólo en la mitad de las pacientes diagnosticadas mediante PCR, lo que confirma la importancia de las técnicas de PCR.

Recientes estudios parecen atribuir a la biovariedad *U. parvum* de *Ureaplasma* spp., un papel

preponderante en la infecciones del embarazo y en la prematuridad. Existe una respuesta inflamatoria intraamniótica relacionada con la dosis de *U. parvum* que, a su vez, se relaciona no sólo con la corioamnionitis, rotura prematura de membranas y parto prematuro, sino también con la sepsis precoz y la displasia broncopulmonar del recién nacido.

Algunos escasos estudios han relacionado *M. genitalium* y *M. fermentans* con infección genital en la mujer, en casos de corioamnionitis y EIP.

Además de los cultivos, el estudio de los marcadores de infección en el LA, como la IL-6 y la prueba de la metaloproteínasa-8 de la matriz (MM-8), pueden ser un factor predictivo de desarrollo de CA.

En los últimos años se están desarrollando nuevas técnicas que utilizan el perfil proteómico como complemento de la pruebas genómicas. Estos estudios aportan información sobre la expresión funcional de las proteínas presentes en los tejidos,

células u organismo en un momento dado. A modo de resumen de esta nueva tecnología, la mayor ventaja que presentan los proteómicos respecto a las técnicas basadas en ADN-ARN es que investigan directamente las moléculas funcionales y no su código genético inicial. El uso de estas nuevas técnicas, permite la identificación de un subgrupo de pacientes que podría beneficiarse de otras medidas para la prevención de la lesión fetal *in útero*, en un futuro. Sin embargo, a pesar de toda la información y evidencia disponible en relación al significado de los micoplasmas en la morbilidad materno-fetal, son necesarios nuevos estudios, a la luz de las modernas técnicas de diagnóstico.

En la figura 4 se resume la respuesta fetal a la inflamación, los mediadores liberados y las posibles complicaciones asociadas.

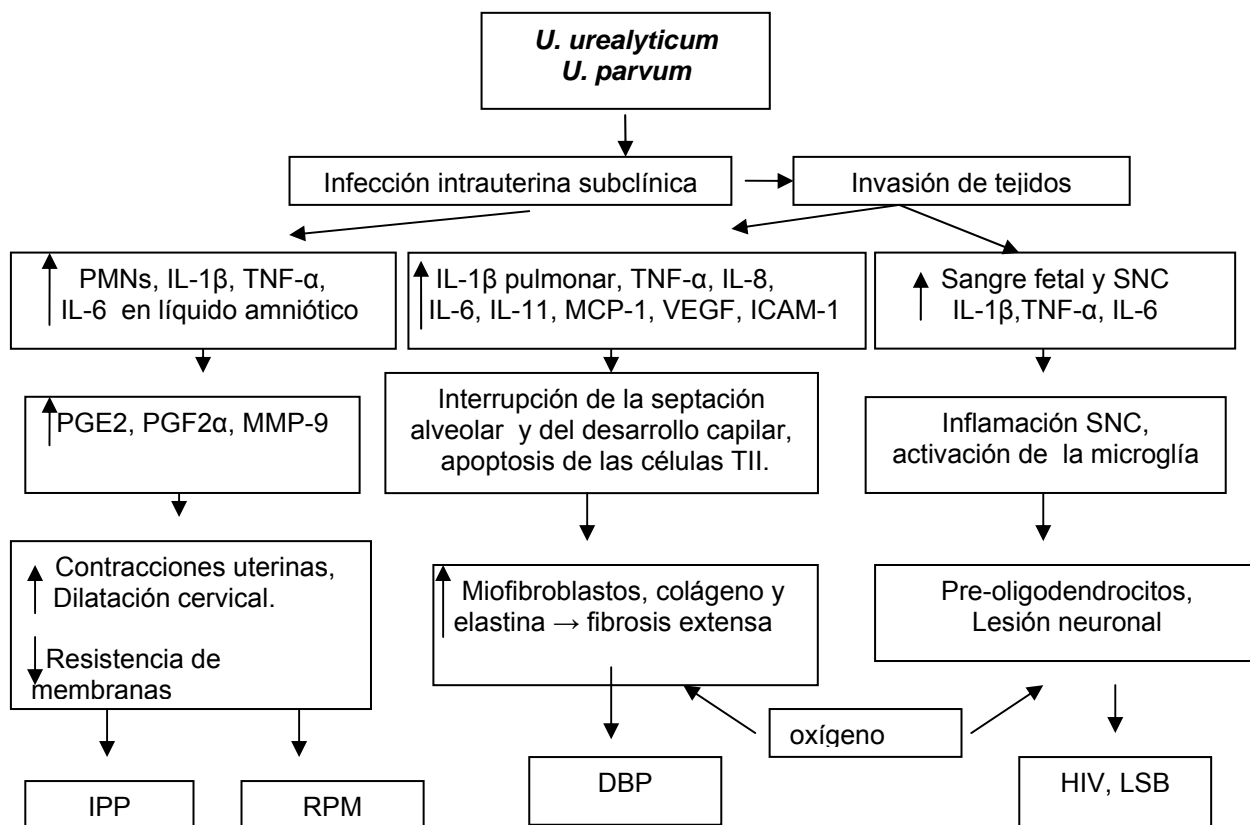


Figura 4. Resumen de las probables vías de inflamación implicadas en el inicio del parto pretérmino (IPP) mediado por *Ureaplasma* spp. y la morbilidad neonatal más frecuente. La infección intrauterina se desarrolla principalmente por vía ascendente o, más raramente, transplacentaria. La interacción entre los patógenos y los receptores del hospedador inicia la respuesta inflamatoria materna y fetal. En la cavidad amniótica, existe una regulación secuencial de las citocinas inflamatorias, atracción de leucocitos, liberación de prostaglandinas y metaloproteinasas que desencadenan las contracciones uterinas, dilatación cervical y rotura de membranas. En el pulmón fetal, la exposición prolongada a las citocinas inflamatorias inhibe el desarrollo alveolar. La invasión sistémica a través del cordón umbilical determina una citocinemia en sangre y/o LCR que conduce a la activación de la microglía y a la lesión neuronal y de los pre-oligodendrocitos.

Abreviaturas:

MCP-1: Proteína-1 para la quimiotaxis de monocitos; VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular; ICAM-1: Molécula-1 de adhesión intercelular; MMP: metaloproteínas de la matriz; RPM: rotura prematura de membranas; HIV: hemorragia intraventricular; LSB: lesión de la sustancia blanca; DBP: displasia broncopulmonar. (Modificado de Viscardi RM, 2010, con permiso de la autora).

4.4.2. Embarazo ectópico (EE). El antecedente de EIP, en especial si ha producido lesión en las trompas de Falopio, puede determinar el desarrollo de EE. *M. hominis* y sobre todo *M. genitalium*, pueden estar relacionados por su posible papel en la EIP, pero son necesarios nuevos estudios para poder establecer con firmeza esta asociación.

4.4.3. Rotura prematura de membranas (RPM). Las pacientes con RPM e invasión de la cavidad amniótica por *Ureaplasma* spp. presentan una respuesta inflamatoria importante en los compartimentos amniótico, fetal y materno. En la revisión Cochrane de Kenyon 2002, el uso de eritromicina en mujeres con rotura de membranas previa al trabajo de parto prematuro, dio lugar a la prolongación del embarazo y a menores riesgos de infección materna y neonatal. El uso de eritromicina en RPM, mostró una reducción significativa del número de lactantes nacidos dentro de las 48 horas de la rotura que requirieron tratamiento con oxígeno (RR 0,87, IC 95%: 0,78- 0,98).

4.4.4. Endometritis postparto (EPP), fiebre postparto, septicemia materna. La endometritis postparto es una complicación importante del embarazo. La infección puede ser precoz (48-72 horas) o tardía (3 días a 6 semanas). Se considera que la EPP precoz se debe a la contaminación del líquido amniótico con microorganismos vaginales durante el trabajo de parto y el parto, y la EPP tardía ocurre por invasión ascendente de las mucosas. Dos tercios son polimicrobianas. La colonización corioamniótica con *Ureaplasma* spp. se asocia con un incremento del riesgo de desarrollar endometritis post-cesárea tres veces mayor y con un aumento del riesgo de ocho veces en mujeres que tuvieron un inicio de parto espontáneo.

Se ha encontrado una diferencia significativa entre las pacientes con endometritis postparto y el grupo control cuando comparan los cultivos positivos de *U. urealyticum* con más de 100.000 UFC. La prevalencia de las biovariedades de *U. urealyticum* en pacientes con endometritis y el grupo control fue similar.

M. hominis y *U. urealyticum* se han aislado en el 10% de los hemocultivos de mujeres con fiebre postparto o postaborto, en algunos casos asociados a otros microorganismos. La bacteriemia es el resultado de la infección ascendente de la vagina, endometrio y membranas placentarias. Sin embargo, la asociación de los micoplasmas con la fiebre, puede hacerse en el caso de que el microorganismo sea aislado en cultivo puro, siendo de otra manera difícil atribuirle un papel causal.

4.4.5. Transmisión vertical. En madres colonizadas, la transmisión vertical de *U. urealyticum* al feto oscila entre el 18-55% en los embarazos a término, y entre el 29-55% en los prematuros. El porcentaje de transmisión vertical, no se modifica según el tipo de parto, pero si presenta un aumento significativo cuando existe corioamnionitis. La transmisión al neonato ocurre: *in útero*, ya sea por vía ascendente, secundaria a la colonización genital

materna o transplacentaria, a partir de la sangre materna, y durante el parto, al atravesar un canal del parto colonizado.

En un estudio en el que se investigó la colonización materna y el parto prematuro, se encontró una transmisión vertical del 60% en niños con peso al nacer < 1.000 gramos, y solamente del 15,3% en aquellos nacidos con más de 1.500 gramos.

En el período postnatal puede producirse transmisión horizontal o nosocomial.

4.5. INFECCIONES NEONATALES

4.5.1. Enfermedad pulmonar del neonato. La neumonía congénita o adquirida durante el nacimiento se relaciona generalmente con la presencia de corioamnionitis. El mecanismo de producción se basa en la inducción por los microorganismo de inflamación con liberación de la cascada de citocinas.

La presencia de *Ureaplasma* spp. en el tracto respiratorio inferior de niños de muy bajo peso al nacer (<1000 g) se ha asociado a neumonía congénita, enfermedad pulmonar crónica del recién nacido, y ocasionalmente muerte fetal. Esto ocurre al menos el doble de veces en los niños infectados y ha sido refrendado por el aislamiento del microorganismo del LA, pulmones del neonato y del corioamnios.

Existen cada vez más pruebas que relacionan a los ureaplasmas con la displasia broncopulmonar del neonato pretérmino. La displasia broncopulmonar (DBP), aparece casi exclusivamente en niños prematuros que han requerido ventilación mecánica. Se ha definido como requerimiento de oxígeno suplementario a los 28 días de edad, o a las 36 semanas de edad postmenstrual, con unas características radiológicas definidas. La etiología es multifactorial y compleja, pero implica un déficit de surfactante y falta de alveolización. Por otra parte, las concentraciones elevadas de oxígeno y la ventilación mecánica potencian el efecto lesivo del ureaplasma en los pulmones.

La exposición a *Ureaplasma* spp. puede ocurrir precozmente en el embarazo y mantenerse durante períodos críticos del desarrollo. La lesión inducida por *Ureaplasma* spp. en el pulmón y el cerebro pretérmino, en una etapa de vulnerabilidad del desarrollo, sería mediada por la respuesta inflamatoria con producción de citocinas inflamatorias en la placenta, sangre, pulmón, y sistema nervioso central (SNC). Los neonatos prematuros colonizados por *Ureaplasma* spp. en el tracto respiratorio tienen concentraciones elevadas de TNF- α , IL-1 β , proteína-1 quimioattractante de monocitos y aumento en la actividad quimiotáctica de los neutrófilos, en comparación con los neonatos no colonizados. Se sugiere que la lesión causada por la infección por ureaplasma ya iniciada intraútero y aumentada después del nacimiento por la exposición al oxígeno produce una alteración de la respuesta inflamatoria en el pulmón inmaduro que impide la alveolización y estimula la proliferación de

miofibroblastos y una deposición excesiva de colágeno y elastina. Sin embargo, aunque la mayoría de los estudios observacionales apoyan la asociación *Ureaplasma* spp. con la DBP, tal vez es prematuro concluir que los ureaplasmas tengan un papel definitivo, ya que en una revisión Cochrane realizada en 2003 no se encuentra un efecto beneficioso en el desarrollo de la DBP por el tratamiento con eritomicina.

4.5.2. Infección sistémica. La bacteriemia por cualquier microorganismo en el neonato se asocia principalmente con el bajo peso al nacimiento. Otros factores incluyen RPM, parto traumático, infección materna, corioamnionitis, e hipoxia fetal. En el caso de los micoplasmas genitales, la infección ocurre en el momento del nacimiento o intraútero. La enfermedad invasora definida por el aislamiento de *Ureaplasma* spp. en sangre y/o LCR, y su relación con el desarrollo neonatal, ha sido menos documentada que la colonización respiratoria y la DBP. Sin embargo, la enfermedad invasora no se relaciona con el desarrollo de DBP.

Globalmente, *Ureaplasma* spp. se ha detectado en 17-26% de muestras de sangre del cordón y puede acompañarse de neumonía grave y meningitis. No obstante, parece poco probable que los micoplasmas genitales sean una causa significativa de bacteriemia fuera del período neonatal, aunque deberían ser considerados en circunstancias especiales.

La infección del SNC por *M. hominis* y *Ureaplasma* spp. ha sido documentada en neonatos a término y pretérmino, como meningitis, y también asociada al desarrollo de hidrocefalia y hemorragia intraventricular. Estos niños con enfermedad grave, probablemente representan una fracción del total de los niños infectados con estos microorganismos, y muchos podrían presentar una infección moderada, frecuentemente subclínica, que se resolvería de manera espontánea.

En un estudio a gran escala *Ureaplasma* spp. (predominantemente la biovariedad *U. parvum*) fue detectado mediante PCR en el suero y/o LCR del

23,6% de los neonatos. Estos niños, presentaban un riesgo 2,3 veces mayor de padecer hemorragia intraventricular.

La tabla 2 muestra un resumen de las asociaciones de los micoplasmas genitales con los diferentes desenlaces adversos del embarazo y otras patologías del neonato.

4.6. OTRAS INFECCIONES EXTRAGENITALES

Las diferentes especies de *Mycoplasma* y *Ureaplasma* spp. pueden producir infección oportunista en pacientes inmunodeprimidos, especialmente con hipogamaglobulinemia, pero también con otros procesos como, enfermedad de Hodgkin, lupus eritematoso, trasplante renal, enfermedad cardíaca, etc.

Es típica la infección de heridas y la producción de abscesos (pélvico, inguinal) por *M. hominis*, por lo general en la primera semana del postoperatorio. Además, se ha asociado a septicemia, infección articular, infección del SNC, e infección del tracto respiratorio.

Ambas especies, *M. hominis* y *Ureaplasma* spp., son causa de infección de la herida esternal, tras cirugía cardiopulmonar, tanto en niños como en adultos. En estos casos, es frecuente el fracaso del tratamiento antibiótico de la infección esternal, sino se demuestra el agente etiológico.

M. hominis y *Ureaplasma* spp. pueden aislarse y detectarse (mediante PCR) en el líquido sinovial de pacientes con hipogammaglobulinemia y en pacientes con artritis reumatoide. Igualmente, *M. fermentans*, se ha considerado causa de algunos casos de artritis reumatoide. Por otra parte, algunos investigadores han relacionado esta especie con el síndrome de fatiga crónica y con distress respiratorio del adulto, con o sin enfermedad sistémica asociada. En la actualidad, se desconoce la verdadera incidencia de la infección por micoplasmas en todas estas situaciones mencionadas.

Tabla 2. Relación de los micoplasmas genitales con morbilidad en el embarazo y con otras patologías.

Enfermedad	<i>M. hominis</i>	<i>Ureaplasma</i> spp.	<i>M. genitalium</i>
Vaginosis bacteriana	++++ / +	+++ / -	+ / -
Embarazo ectópico	++ / +	+ / -	++ / -
Bajo peso al nacer	+ / -	+++ / +	
Parto pretérmino	++ / -	+++ / ++	++ / +
Fiebre materna	+++ / ++	++ / +	?
Enfermedad respiratoria neonatal	+ / ?	+++ / ++	?

Posibilidad de que el micoplasma indicado esté asociados con/sea agente causal de los cuadros reseñados en la columna izquierda: ++++ demostrado; +++ buena; ++ moderada; +pequeña; - nula; ? desconocido.

(Tomado de Taylor-Robinson, Int J Obstet Gynaecol (BJOG), 2011).

5. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES POR MICOPLASMAS

5.1. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

5.1.1. Introducción. La dificultad para aislar *M. pneumoniae* de muestras respiratorias, ha sido el principal factor condicionante para que el diagnóstico de la neumonía causada por esta bacteria, se haya abordado tradicionalmente por técnicas serológicas. La actual disponibilidad de técnicas de PCR para su rápida detección hará necesario definir la utilidad de cada uno de los métodos y sus respectivas indicaciones. En este apartado se valoran las diferentes técnicas serológicas actualmente disponibles y su aplicabilidad en la práctica diaria.

La serología ha sido la principal herramienta diagnóstica, en parte por la facilidad de recogida de la muestra, y en parte por la disponibilidad de múltiples pruebas. No ocurre lo mismo en relación al diagnóstico serológico de las infecciones causadas por los denominados "micoplasmas genitales" (*M. hominis*, *Ureaplasma* spp. y *M. genitalium*). Por una parte, su facultad de colonizar habitualmente las mucosas del tracto urogenital dificulta la interpretación de los títulos de anticuerpos y su mera presencia no se considera significativa. Por otra, ninguna de las técnicas serológicas empleadas (inmunofluorescencia, EIA e inhibición metabólica) proporciona resultados satisfactorios en el diagnóstico de las infecciones genitales, por lo que estas técnicas no se encuentran comercializadas.

Mycoplasma pneumoniae posee en su membrana externa antígenos proteicos y glicolipídicos que generan una respuesta de anticuerpos en los individuos infectados. La proteína P1 es la principal diana de la respuesta de anticuerpos y es también el antígeno más usado en las técnicas serológicas.

En el individuo inmunocompetente se produce una respuesta rápida de anticuerpos que llega a su máximo en 21-40 días, para ir posteriormente disminuyendo en meses o años. La respuesta inicial de IgM específica aparece durante la primera semana de infección y unas 2 semanas antes de la producción de IgG. La respuesta de IgM es importante en la población infantil pero no se observa en la población adulta, que generalmente ha sido infectada repetidamente por *M. pneumoniae*. Así la ausencia de IgM no descarta la infección, ni tampoco su presencia la confirma dado que puede persistir meses o incluso años. Los anticuerpos IgG específicos permanecen elevados durante un tiempo prolongado de hasta cuatro años según algunos autores. Así, títulos bajos de anticuerpos IgG pueden indicar infección reciente o pasada. En esta situación, una segunda determinación a las 2-3 semanas permite demostrar, o no, un aumento significativo en el título de anticuerpos.

Para muchos autores el criterio de referencia para el diagnóstico de la neumonía por *M. pneumoniae* es la demostración de un incremento de, al menos cuatro veces, el título de anticuerpos en muestras de suero pareadas. Entendiendo por muestras pareadas las obtenidas, la primera, en la fase aguda de la infección y la segunda a las 3 semanas. Ambas

muestras deben ser testadas conjuntamente para poder determinar correctamente la variación en el título de anticuerpos.

5.1.2. Técnicas serológicas. A lo largo de los años se han utilizado diferentes técnicas serológicas para el diagnóstico de la infección por *M. pneumoniae*.

5.1.2.1. Crioaglutininas. Las crioaglutininas son anticuerpos IgM contra el antígeno I de los eritrocitos que se detectan por aglutinación a 4°C de hematíes del grupo O, Rh negativos. Tras la infección por *M. pneumoniae* entre un 30 y un 70% de los pacientes presentan este tipo de anticuerpos a títulos $\geq 1/32$.

También pueden generar estas aglutininas virus como Epstein-Barr o citomegalovirus, algunas bacterias como *Klebsiella pneumoniae*, o enfermedades del colágeno y enfermedades neoplásicas. Dada su baja sensibilidad y limitada especificidad, no se considera, actualmente una técnica útil para el diagnóstico de la infección por *M. pneumoniae*.

5.1.2.2. Fijación de complemento. Considerada como técnica *gold standard* para el diagnóstico serológico de la neumonía por *M. pneumoniae*, se puede realizar utilizando como antígeno bien la bacteria completa o bien un extracto glicolipídico. Como es bien conocido, la técnica de fijación de complemento (FC) determina indistintamente la presencia de anticuerpos IgG e IgM.

El prolongado periodo de incubación tras la infección por *M. pneumoniae*, permite, a menudo, demostrar un título significativo ($>1/32$) de anticuerpos por técnica de FC en la muestra de suero obtenida en la primera consulta del paciente, durante la fase aguda de la enfermedad.

En los múltiples estudios publicados la sensibilidad y especificidad varía entre el 65-90% y el 88-97%, respectivamente con valor predictivo positivo (VPP) de 87% y valor predictivo negativo (VPN) del 89%. Además de los VPP y VPN referidos, los principales inconvenientes de la técnica de fijación de complemento son su laboriosidad, su difícil estandarización y el requerir de personal muy entrenado y cualificado. Existe un sistema automatizado (Seramat®) para la realización de la FC que ha sido favorablemente evaluado, con concordancia del 100% para la prueba de micoplasma.

Es importante también recordar que en el suero de los pacientes con meningitis bacteriana se pueden detectar títulos muy elevados de anticuerpos frente a micoplasma, especialmente cuando se realiza la determinación por la técnica de FC.

5.1.2.3. Técnicas de aglutinación de partículas sensibilizadas. Las técnicas de aglutinación permiten detectar tanto IgM como IgG.

Para el diagnóstico de *M. pneumoniae* se han usado reactivos de aglutinación con partículas de látex, con hematíes o con partículas de gelatina. Estas últimas son las más usadas actualmente y utilizan una mezcla de antígenos glicolipídicos obtenidos de extractos de cultivos.

La técnica de aglutinación de partículas de gelatina (Serodia-Myco II. Fujirebio), utiliza antígeno P1 de *M.*

pneumoniae. Permite una cuantificación de los anticuerpos en base a un banco de diluciones a partir de 1/40. Según el fabricante deben considerarse positivos los títulos $\geq 1/40$. Sin embargo algunos autores sugieren que los criterios a aplicar para esta técnica deben ser:

- un incremento de al menos cuatro veces en el título de anticuerpos
- título $\geq 1/160$ en al menos una muestra
- título $\geq 1/320$ en la fase aguda

En población infantil y juvenil, en el contexto de una neumonía no filiada, a menudo ya en la primera muestra de suero se puede detectar un título significativo de anticuerpos. En nuestra experiencia, cuando la sospecha diagnóstica es importante (por razones clínicas o epidemiológicas), y no se detectan anticuerpos, o bien son positivos a título bajo ($\leq 1/80$), la repetición de la determinación en una muestra de suero obtenida 48-72 horas después, permite demostrar un incremento significativo en el título de anticuerpos, sin necesidad de esperar hasta tres semanas para obtener otra muestra de suero.

En la bibliografía actualmente disponible existen numerosas evaluaciones de esta técnica con resultados dispares. Probablemente la aplicación estricta del criterio del fabricante (1/40) o la aplicación del segundo criterio (1/160 o 1/320) son responsables de estas variaciones.

En el cómputo de ventajas y desventajas de la técnica cabe señalar, que aún no siendo estrictamente una técnica de diagnóstico rápido (como puede ser la inmunocromatografía o el EIA de membrana) se puede disponer del resultado en cuatro horas.

5.1.2.4. Técnicas de enzimoimmunoanálisis (EIA).

Desde la comercialización de técnicas de EIA, su uso se ha impuesto en la mayoría de laboratorios. Existe una amplia variedad de reactivos comercializados en base a preparados antigénicos diversos, como la mezcla de antígenos crudos, las proteínas purificadas, glucolípidos purificados o péptidos sintéticos. También se dispone de diferentes presentaciones bien en microplaca, bien en soporte de membrana para la detección de IgM, o técnicas de captura de la cadena pesada μ de la inmunoglobulina.

Los numerosos trabajos publicados comparando los diferentes reactivos disponibles en el mercado, presentan resultados muy variados. El primer problema es definir el *gold standard* comparativo. Algunos autores se basan en la detección de *M. pneumoniae* por PCR en muestra respiratoria, hecho que otros autores consideran no válido puesto que puede haber entre un 5,1 y un 13,5% de portadores asintomáticos (incluyendo el periodo de incubación y el periodo de persistencia del patógeno después de la infección). La comparación de resultados también se ve afectada por los diferentes antígenos utilizados en los reactivos comerciales. Y además, son variables muy importantes la edad de los pacientes del estudio, el momento evolutivo de la infección cuando se recoge la muestra y finalmente la

disponibilidad de una segunda muestra de suero en la fase de convalecencia.

En los estudios comparativos de EIA en población adulta, se reportan valores predictivos positivos del orden de 60-80% y valores predictivos negativos de 83-94%.

En la población infantil el diagnóstico puede realizarse por detección de IgM con una sensibilidad del 81-89%. Sin embargo algunos reactivos presentan un porcentaje inaceptable de falsos positivos (de hasta el 82%) lo que obliga a seleccionar cuidadosamente el producto a utilizar.

La especificidad de la detección de IgG es más difícil de evaluar, dado que puede tratarse de anticuerpos específicos por infecciones pasadas. En esta circunstancia únicamente la demostración de un incremento significativo tiene valor diagnóstico.

5.1.2.5. Prueba de la inhibición metabólica.

El fundamento radica en la inhibición del crecimiento de los micoplasmas en cultivo en caldo por la presencia de anticuerpos específicos frente a ellos. El sistema indicador se basa en el cambio de color del indicador del pH del medio como consecuencia de la fermentación de la glucosa, hidrólisis de la arginina o hidrólisis de la urea, según la especie de micoplasma estudiada. Enfrenta directamente una cepa de micoplasma en crecimiento en su medio de cultivo adecuado con el suero del paciente, cuyo título de anticuerpos se quiere determinar. Se lleva a cabo en placa de microtitulación y se realizan diluciones seriadas del suero. La prueba se realiza con suspensiones conteniendo 10^3 y 10^5 UCC/ml del microorganismo, respectivamente. El título más alto de la dilución del suero en cuyos pocillos no se produzca cambio de color del medio (inhibición del crecimiento del microorganismo) corresponde al título de anticuerpos. La técnica puede ser aplicable para la detección de anticuerpos frente a especies de micoplasmas para los que no existen técnicas comercializadas, como los micoplasmas genitales, pero es laboriosa y reservada para laboratorios con experiencia en el cultivo de estos microorganismos.

5.1.2.6. Otras técnicas.

Las técnicas de inmunofluorescencia indirecta con conjugados específicos (IgG o IgM) a pesar de ofrecer resultados reproducibles y cuantificables, no parecen tener un amplio uso. La laboriosidad y la subjetividad de la interpretación de los resultados han sido, probablemente, los factores limitantes para su difusión.

5.1.3. Recogida y conservación de la muestra.

La toma de sangre y su procesamiento para la separación del suero se harán según procedimientos habituales de extracción de sangre y centrifugación para obtener el suero.

El suero no debe permanecer a temperatura ambiente, manteniéndose a 4°C desde su separación hasta la realización de la técnica por un periodo máximo de 72 horas. Si la determinación se difiere en el tiempo por periodos mayores, así como para su archivo, deberá mantenerse congelado a -70°C.

5.1.4. Interpretación e información de los resultados. Cada técnica y cada fabricante recomiendan sus propios criterios de interpretación de resultados. A modo de resumen conceptual es importante recordar:

1. La presencia de IgM en población infantil es, en general, indicador de infección aguda, aunque puede persistir meses o incluso años.
2. La ausencia de IgM en la población adulta no descarta la infección por micoplasma, puesto que infecciones previas condicionan una respuesta únicamente de IgG.
3. Se debe seleccionar y validar cuidadosamente el reactivo de detección de IgM, para evitar un índice inaceptable de resultados falsamente positivos.
4. La detección de IgG o de inmunoglobulinas totales a título bajo pueden significar una infección pasada o incipiente. Para discernir la situación es necesario repetir la determinación en una muestra de suero obtenida al cabo de 3 semanas. Señalar que a menudo, en situaciones de alta probabilidad, basta repetir la determinación en una nueva muestra de suero a los 2-3 días.
5. Es posible detectar *M. pneumoniae* en una muestra respiratoria por técnica de PCR en portadores asintomáticos

5.2. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO BASADO EN EL CULTIVO

Todas las especies de micoplasmas requieren medios de cultivos complejos, compuestos por esteroides, ácidos grasos, aminoácidos y otros compuestos que satisfagan sus requerimientos nutricionales. Su elaboración es minuciosa y requiere controles de todos y cada uno de sus componentes. Por ello, pocos laboratorios clínicos ofrecen el cultivo como medio de diagnóstico de las infecciones por micoplasmas. Sin embargo, el cultivo sigue siendo esencial para la caracterización biológica y molecular de los aislados clínicos, incluidos los estudios de resistencia.

El cultivo de los micoplasmas de origen humano sólo se debe realizar para el aislamiento de especies con potencial patogénico definido y crecimiento razonablemente satisfactorio en medios específicos estandarizados, como *Ureaplasma* spp., *M. hominis* y *M. pneumoniae*. Las especies de crecimiento extremadamente fastidioso, como *M. genitalium*, *M. fermentans* y *M. penetrans* se deben detectar por técnicas de amplificación de ácidos nucleicos.

Igualmente, el cultivo de los micoplasmas sólo se debe realizar en los pacientes con procesos infecciosos en los que se haya demostrado la significación etiológica de estos microorganismos.

Los medios de cultivo, todos complejos en su composición, se basan en: caldo infusión cerebro-corazón, peptona, extracto de levadura, suero (bovino fetal, de caballo), otros varios suplementos de aminoácidos, antibióticos (para inhibir la contaminación acompañante), un metabolito (glucosa o arginina o urea) de acuerdo con la

especie de micoplasma que se cultive y rojo fenol como indicador del pH. Los medios sólidos se basan en la misma composición que los caldos, adicionados de agar.

Actualmente, la disponibilidad en el mercado de medios de cultivo estandarizados facilita enormemente en los laboratorios de microbiología asistenciales la realización de los cultivos de las tres especies anteriormente mencionadas.

5.2.1. Cultivo de *Mycoplasma pneumoniae*

5.2.1.1. Obtención de la muestra. Las muestras respiratorias apropiadas incluyen los frotis de exudado faríngeo y nasofaríngeo, esputo, aspirado bronquial y endotraqueal, líquido de lavado broncoalveolar, líquido pleural y biopsias de tejido pulmonar.

Las muestras extrapulmonares a cultivar deberán reflejar el lugar de la infección y el proceso sospechado, como LCR, líquido pericárdico, líquido sinovial, líquido de vesículas cutáneas o timpánicas y sangre o suero.

Las torundas deberán ser de alginato cálcico, dacrón, o poliéster, con vástago de aluminio o plástico, pero nunca emplear torundas de algodón y vástago de madera, por su efecto inhibitorio sobre el microorganismo.

La toma del exudado faríngeo deberá realizarse mediante frotamiento vigoroso de la mucosa, con el fin de desprender las células epiteliales a las que el microorganismo podría estar adherido.

5.2.1.2. Transporte y conservación. Debido a la gran sensibilidad de *M. pneumoniae* a la desecación, todas las muestras deberán transportarse inmediatamente al laboratorio para su procesamiento inmediato o refrigerarse a 4°C. Esto es especialmente necesario en el caso de las muestras recogidas con torundas, que deberán ser inoculadas inmediatamente (tiempo máximo de 1 hora en el laboratorio), introducidas en un medio de transporte adecuado o en el propio medio de cultivo SP-4. El resto de las muestras (esputos, líquidos o tejidos), pueden ser remitidas en envases estériles sin ningún medio de transporte o de cultivo, siempre que vayan a ser inoculados en un tiempo máximo de 1 hora. Si la inoculación en el laboratorio se retrasa más de 24 horas, las muestras se conservarán congeladas a -70°C.

5.2.1.3. Manejo de la muestra en su recepción en el laboratorio. Implica el cumplimiento de los requisitos de calidad de la muestra para ser procesada, como se indica en el Procedimiento de Microbiología de la SEIMC 1a: "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología". Deben cumplirse los criterios de aceptación siguientes:

- a) Muestra acompañada de un volante de petición con los datos demográficos del paciente, servicio y facultativo peticionario, tipo de muestra, motivo de la petición y determinaciones solicitadas.
- b) Identificación del paciente y de la muestra en el recipiente que la contiene.
- c) Valoración de la cantidad de muestra en relación con los estudios solicitados.

- d) Comprobación del tiempo de recogida y las condiciones de transporte.
- e) Evaluación de la conveniencia de los cultivos solicitados.
- f) Se aplicarán los criterios de rechazo de la muestra en relación con el incumplimiento de las normas de transporte y conservación anteriormente expuestas.

5.2.1.4. Procesamiento de la muestra. Las torundas y 0,2 ml de las demás muestras (esputos, secreciones respiratorias y sedimentos de los líquidos orgánicos) se inocularán directamente en un tubo con caldo SP-4 (1,8 ml). A continuación se realizarán diluciones 1:10 seriadas (al menos 10^{-3} diluciones) y se incubarán en aerobiosis. Además, siempre se incluirá la inoculación directa (50 μ l) de la muestra en una placa de agar.

Los líquidos orgánicos, se centrifugarán antes de la inoculación (3.500 rpm, 15 minutos) y los esputos se fluidificarán previamente (si fuera necesario).

Es importante que la inoculación de las muestras se realice mediante diluciones seriadas del medio, para evitar las posibles interferencias con antibióticos, anticuerpos y otros inhibidores presentes en la muestra.

5.2.1.5. Selección de medios y condiciones de incubación. En la actualidad, el medio más utilizado es el medio SP-4 de Tully (caldo y agar), compuesto por caldo infusión cerebro-corazón, peptona, extracto de levadura, suero bovino fetal, varios suplementos (CMRL), antibióticos (para inhibir la contaminación acompañante), glucosa (como metabolito) y rojo fenol como indicador del pH. En la actualidad, este medio también existe comercializado (Medio SP-4. Remel Laboratorios, Lenexa, Kans). Como medio sólido, además del agar SP-4, también se puede utilizar el agar modificado de Hayflicks e, incluso, el agar diferencial A7 (para micoplasmas genitales). También se dispone de un medio bifásico (agar y caldo) comercializado (Mycotrim. Irving Scientific).

Si los medios se preparan en el laboratorio de microbiología, se deben realizar controles de calidad de cada uno de los componentes y controles de cada nuevo lote preparado con cepas patrón o cepas de aislados clínicos con pocos pasajes.

5.2.1.6. Cultivos. La detección de *M. pneumoniae* en el medio de cultivo se basa en su capacidad de metabolizar la glucosa con producción de ácido láctico y acidificación del pH, que se manifiesta por un cambio gradual del color del medio (del fucsia al naranja y, luego, al amarillo) sin producir turbiedad. Cualquier caldo que presente un cambio de color, deberá subcultivarse en un nuevo tubo con medio SP-4 y en una placa de agar. Igualmente, Aunque no se produzca cambio de color se deben realizar subcultivos ciegos (cada semana) a lo largo del período total de incubación, que nunca será inferior a 6 semanas, ya que *M. pneumoniae* tiene una tasa de crecimiento muy lenta.

Las placas de agar deben ser observadas periódicamente (cada 5 días) con microscopio estereoscópico para ver el desarrollo de las típicas colonias de 100 μ m de diámetro que pueden

presentar, o no, forma de huevo frito. La incubación aerobia a 35-37°C es satisfactoria, pero las colonias se desarrollan mejor en atmósfera con 5-10% de CO₂. (Figura 5).

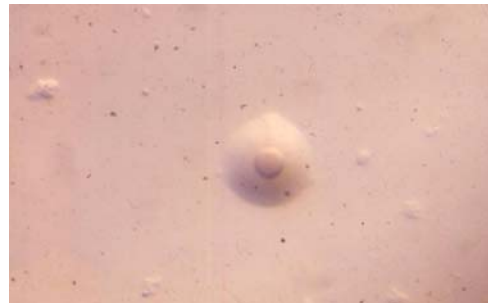


Figura 5. Colonia característica de *Mycoplasma pneumoniae*.

El crecimiento fastidioso del microorganismo, la necesidad de medios específicos complejos, caros y escasamente comercializados, el largo periodo de incubación y la complejidad del proceso, con la necesidad de subcultivos ciegos, hace que el cultivo sea poco práctico y de poca utilidad para el tratamiento de los pacientes. Muy pocos laboratorios clínicos ofrecen el cultivo como medio de diagnóstico de las infecciones por *M. pneumoniae*. Por otra parte, la sensibilidad es inferior al 50% respecto de la serología, incluso en los laboratorios de referencia. Por ello, desde la descripción original hace más de 40 años, la serología ha sido el método diagnóstico más ampliamente utilizado y en la actualidad el cultivo está siendo desplazado por las técnicas moleculares (PCR).

Sin embargo, el cultivo sigue siendo esencial para la caracterización biológica y molecular de los aislados clínicos y para los estudios de resistencia (especialmente ahora que se han descrito algunas cepas con resistencia a los macrólidos).

El metabolismo de la glucosa (en 7-12 días) y el crecimiento de las típicas colonias en agar, permite establecer la identificación presumptiva de *M. pneumoniae*. Sin embargo, para la identificación de certeza de la especie es necesario realizar alguna de las pruebas complementarias siguientes: la hemadsorción de eritrocitos de cobaya, la reducción del tetrazolio, la inhibición del crecimiento del microorganismo con el antisuero homólogo específico, la epi-inmunofluorescencia con antisuero específico, o técnicas de PCR. Desafortunadamente, ninguno de estos métodos ha sido desarrollado comercialmente para facilitar su realización. No obstante, de todas ellas la hemadsorción y, sobre todo, una prueba rápida con un derivado del tetrazolio son los procedimientos más empleados.

La hemadsorción se realiza inundando la placa de agar con las colonias frescas con una suspensión al 5% de eritrocitos de cobaya, lavados previamente, incubando a temperatura ambiente durante 30 minutos y lavando suavemente con solución salina estéril. La observación de las colonias al microscopio mostrará su superficie recubierta de eritrocitos. Con

el tiempo, los eritrocitos serán lisados por el H₂O₂ producido por el microorganismo.

La prueba rápida se basa en la capacidad única de *M. pneumoniae* para reducir el compuesto trifenil-tetrazolio (incoloro) a formazán (rojo). Se realiza inundando las colonias frescas con 2 ml de una solución estéril al 0,21% de INT (yodo-trifenil-tetrazolio) y posterior incubación a 37°C durante 20-60 minutos. Durante la incubación, las colonias de *M. pneumoniae* se tiñen de color rosa o púrpura. El resto de los micoplasmas (excepto *M. genitalium*) no se teñirán.

5.2.1.7. Criterios de interpretación de los resultados.

El aislamiento de *M. pneumoniae* (cualquier título de crecimiento), de las muestras respiratorias es significativo clínicamente en la mayoría de los casos y debe correlacionarse con la presencia de signos y síntomas de enfermedad respiratoria clínica, ya que puede existir una pequeña proporción de portadores asintomáticos.

Por otra parte, la persistencia de *M. pneumoniae* durante periodos variables de tiempo después del padecimiento de una infección aguda, dificulta el establecimiento de la significación de su aislamiento. Por ambas razones, su valoración debe siempre acompañarse de la realización de pruebas serológicas.

El aislamiento de *M. pneumoniae* de un líquido orgánico teóricamente estéril, es siempre valorable y confirmatorio de su papel etiológico en las manifestaciones extrapulmonares que acompañan a la infección por este microorganismo.

5.2.1.8. Procedimientos adicionales a realizar en situaciones especiales.

M. pneumoniae mantiene constante su patrón de sensibilidad a los antibióticos (macrólidos, tetraciclinas y quinolonas), por lo que, hasta ahora, no se considera necesaria la realización de pruebas de sensibilidad a los antibióticos. No obstante, dada la reciente aparición en Japón de cepas con resistencia a los macrólidos por mutación en el 23S ARNr, sería conveniente el archivo de las cepas aisladas con el fin de realizar estudios de sensibilidad si fuera necesario. Igualmente, para la determinación de los dos subtipos predominantes de la proteína P1 en los brotes epidémicos.

5.2.2. Cultivo de *Ureaplasma* spp. y *Mycoplasma hominis*

5.2.2.1. Obtención de la muestra.

Muestras del tracto genitourinario. En el hombre, la muestra adecuada para el estudio de uretritis o prostatitis es la torunda uretral. *M. hominis* y *Ureaplasma* spp. colonizan la mucosa uretral y el surco balano-prepucial en el hombre no circuncidado. En la mujer, las muestras vaginales son más adecuadas para la recuperación de *M. hominis* y *Ureaplasma* spp. que las de endocérnix, fornix posterior o uretra, pero sólo para estudios de vaginosis, ya que a ninguna de las dos especies se les reconoce un papel etiológico en la vaginitis.

En la mujer, las muestras adecuadas para el diagnóstico de las infecciones del tracto genital alto, como la endometritis o la enfermedad inflamatoria pélvica, son únicamente las obtenidas

mediante procedimientos invasivos (laparoscopia) o durante la cirugía, ya que toda muestra recogida a través de la vagina arrastrará parte de la microbiota colonizadora y no permitirá valorar el aislamiento de los micoplasmas. Lo mismo ocurre con las muestras para el diagnóstico de corioamnionitis o de la infección del líquido amniótico.

Por la misma razón, en ambos sexos, para el diagnóstico de pielonefritis se requiere una muestra de orina obtenida por punción suprapúbica, ya que la orina de micción espontánea no es válida por arrastrar los micoplasmas colonizadores del tracto genital.

Se aconseja el uso de torunda de alginato de calcio, dacrón, o poliéster, con vástago de aluminio o plástico. Debe evitarse el uso de torundas de algodón y vástago de madera, que pueden tener efecto inhibidor.

Frotis vaginal y frotis cervical. No utilizar ningún tipo de antiséptico. Realizar la toma con torunda con medio de transporte.

Frotis uretral. Limpiar el meato urinario y realizar frotis de la mucosa uretral con torunda adecuada, al menos 3 horas después de la última micción.

Estudio de prostatitis crónica. Para valorar la localización de la infección son necesarios tres tipos de muestras: exudado uretral (torunda), orina postmasaje prostático (envase estéril) y exudado prostático o líquido seminal (envase estéril).

Estudio de pielonefritis. Se requiere muestra de orina obtenida por punción suprapúbica (envase estéril).

Otras muestras:

Líquidos orgánicos. Orina, líquido seminal, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, líquido amniótico. Recoger en frasco estéril, sin necesidad de medio de transporte. La orina se recogerá del primer chorro de la micción.

Aspirado traqueal. Es una muestra útil en neonatos, y se recoge en medio de transporte para micoplasmas.

Tejidos sólidos. Se utilizará un frasco estéril con medio de transporte, para evitar la desecación de la muestra.

Aspirados de heridas. Se recogen con torunda, o preferentemente con jeringa.

Sangre. Se inoculará en dilución 1:10 en caldo urea-arginina, u otro caldo adecuado para crecimiento de micoplasmas. Se recomienda un volumen de sangre de unos 10 ml, por lo que pueden ser necesarios varios viales de medio. Los sistemas automatizados de hemocultivo, con monitorización continua del cultivo, no son eficaces para la detección de crecimiento de *M. hominis* y *Ureaplasma* spp. En casos en los que se sospecha la infección por este microorganismo, debe realizarse un subcultivo a ciegas en medio adecuado para crecimiento de micoplasmas.

5.2.2.2. Transporte y conservación de la muestra.

Los micoplasmas son muy sensibles a la desecación y al calor, por lo que lo ideal es que las muestras sean inoculadas inmediatamente en un medio de transporte y/o cultivo adecuado.

Las muestras deben ser transportadas lo antes posible al laboratorio. Pueden mantenerse hasta 24 horas a 4°C antes de inocular en medio de crecimiento. Si el cultivo se retrasa por períodos más prolongados, se conservarán congeladas a -70°C. El almacenamiento a -20°C, incluso por períodos cortos de tiempo, produce pérdida de la viabilidad.

Las muestras líquidas no necesitan medio de transporte, si se inoculan en el tiempo de una hora desde la realización de la toma de muestra. Las muestras de tejidos se introducen en recipiente estéril y puede añadirse medio de transporte para evitar la desecación.

5.2.2.3. Manejo de la muestra en su recepción en el laboratorio. Las muestras deben ser correctamente identificadas, comprobando que han sido recogidas en los medios adecuados, así como el tiempo transcurrido desde la toma y las condiciones de almacenamiento, antes de la recepción en el laboratorio. Deben respetarse las condiciones de mantenimiento adecuadas.

5.2.2.4. Procesamiento de la muestra. Las muestras deben homogeneizarse antes de la inoculación en el medio de cultivo. Los líquidos deben ser centrifugados (600xg, durante 15 min.) y el sedimento inoculado. En los casos en que se sospeche contaminación bacteriana, la muestra puede ser filtrada a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,45 µm. En muestras de tejidos, se recomienda cortar y no homogeneizar. La realización de diluciones seriadas decimales de la muestra en caldo, al menos hasta 10⁻³, realizando un subcultivo de cada dilución en agar, es un paso importante que puede evitar la inhibición producida por los antibióticos, anticuerpos y otros inhibidores, incluyendo bacterias que puedan estar presentes en la muestra. La dilución también ayuda a solucionar el problema de la rápida pérdida de viabilidad, particularmente importante en *Ureaplasma* spp.

Cuando sea necesario cuantificar la carga de micoplasmas presentes en la muestra (uretritis y prostatitis) y se utilicen medios de cultivos preparados en el propio laboratorio, en lugar de medios comercializados listos para su uso, es obligatorio realizar diluciones seriadas (10⁻⁵) de la muestra en el medio de cultivo. Estas diluciones permitirán determinar el título de crecimiento del microorganismo en cada una de las muestras y establecer comparaciones entre ellas (indicación de localización anatómica). Los títulos de crecimiento se expresan en unidades cambiadoras de color por mililitro (UCC/ml). Los equipos comercializados también cuantifican el crecimiento, bien estableciendo una equivalencia entre el número de colonias crecidas en la placa con títulos de unidades formadoras de colonias (UFC), bien por cambio de color en pocillos que indican un título fijo de crecimiento ($\geq 0 \leq 10^4$ UCC/ml).

5.2.2.5. Selección de medios y condiciones de incubación. El crecimiento de los micoplasmas requiere la presencia de suero, factores de crecimiento como extracto de levadura y un sustrato metabólico. No existe una formulación ideal para todas las especies, con los requerimientos de pH y sustratos adecuados. El caldo 10B de Shepard, y el caldo urea-arginina pueden ser utilizados para aislar *M. hominis* y *Ureaplasma* spp. La penicilina G o una penicilina semisintética se utilizan para evitar el sobrecrecimiento de otras bacterias. El rojo de fenol se incluye en el caldo como indicador de crecimiento (cambio del pH).

El agar diferencial A7 y varias modificaciones del mismo, (A7B, A8) son particularmente útiles porque permiten el crecimiento de *M. hominis* y *U. urealyticum* y diferencian una especie de otra por la morfología de la colonia. Combina una base nutritiva a base de peptonas, suero de caballo y factores de crecimiento (cisteína, PolyVitex, arginina, urea) que favorecen el desarrollo de las colonias de micoplasma. La mezcla antibiótica del medio, inhibe el crecimiento de bacterias grampositivas y gramnegativas.

Existen medios comerciales disponibles, Mycotrim Triphasic® (antes llamado Mycotrim GU), que incluye un medio bifásico que contiene agar diferencial A8 y caldo urea-arginina en un frasco de cultivo celular, con rojo de fenol como indicador.

El sistema Micoplasma IST bioMérieux®, permite la detección de *Ureaplasma* spp. y *M. hominis* con un resultado cuantitativo y el estudio de la sensibilidad.

El uso combinado del caldo Urea-Arginina (Micoplasma IST bioMérieux®) y el Agar A7 bioMérieux®, es adecuado como medio de aislamiento y su utilización se describe en el documento técnico PNT-M-03 de este procedimiento. La inoculación debe hacerse en ambos medios, líquido y sólido, para poder diferenciar el tipo de colonia, la posibilidad de cultivos mixtos y la cuantificación de los aislados.

Los caldos se incuban a 37°C en atmósfera aerobia. Las placas de agar deben incubarse en atmósfera suplementada con 5-10% de CO₂ (utilizando sistema generador), ya que *Ureaplasma* spp. requiere CO₂ para su crecimiento y las colonias de *M. hominis* crecen mejor.

5.2.2.6. Cultivos. Se deben observar los cambios de color en los viales de caldo a partir de las 24 horas de incubación (especialmente en el caso de *Ureaplasma* spp.).

M. hominis y *Ureaplasma* spp. al crecer y liberar iones amonio de sus respectivos sustratos producen cambio del color del medio del amarillo al naranja-rojo-púrpura en 24 horas, excepto en caso de muestras con títulos muy pequeños en las que el cambio se producirá en ≥ 48 horas.

En el caso de *M. hominis* aparece una ligera turbidez, y en caso de *Ureaplasma* spp. el caldo permanece transparente. En ambos casos el subcultivo a medio sólido debe ser realizado precozmente una vez que se produce el cambio de

color, debido a la rápida pérdida de viabilidad una vez que se alcaliniza el medio. La viabilidad disminuye rápidamente al elevarse el pH del medio como consecuencia de la utilización del sustrato.

Los subcultivos se inspeccionan diariamente, de la misma manera que el cultivo inicial.

El subcultivo en placa de agar se hará dispensando en cada placa 3 gotas del caldo, sin estriar. El rápido crecimiento de estos micoplasmas permite la identificación de la mayoría de los cultivos positivos en 2-4 días de incubación.

En ocasiones y de manera ocasional, *M. hominis* puede crecer, tras incubación prolongada, en medios convencionales como agar Columbia sangre o chocolate, donde producen colonias pequeñísimas y transparentes, que teñidas al Gram no permiten observar ningún microorganismo. La confirmación de que corresponden a *M. hominis* se obtiene mediante el arrastre de una pequeña pieza de agar que las contenga sobre una placa de agar A7 o mediante su introducción en caldo de arginina.

En los cultivos cuantitativos de *Ureaplasma* spp. realizados mediante diluciones seriadas con medios preparados en el laboratorio, al final del periodo de incubación se anotará el título máximo de crecimiento del organismo. La dilución más alta que muestre cambio de color equivale al recíproco del número de unidades cambiadoras de color (UCC) presentes en el inóculo original. Los títulos de crecimiento se expresarán en UCC/ml. Si se realiza el recuento de colonias, siempre se debe realizar según las instrucciones del fabricante cuando se utilizan medios comerciales, y teniendo en cuenta las diluciones utilizadas en cada caso. Cuando la cuantificación se hace por crecimiento en placas de agar, los títulos de crecimiento se expresarán en unidades formadoras de colonias (UFC).

La lectura de las placas se puede hacer con microscopio invertido orientando la superficie del agar hacia arriba, o con microscopio estereoscópico de epiiluminación orientando la superficie hacia abajo, con aumento 40x, y 100x.

Las colonias de *Ureaplasma* spp. en agar A7, A7B y A8 presentan un aspecto característico de "erizo de mar", entre 15-50 μm de diámetro y de color marrón oscuro debido a la deposición de sales de manganeso (agar A7) o de CaCl_2 (agar A8) sobre la colonia. Las colonias de *M. hominis* aparecen con su aspecto característico de "huevo frito". (Figura 6).

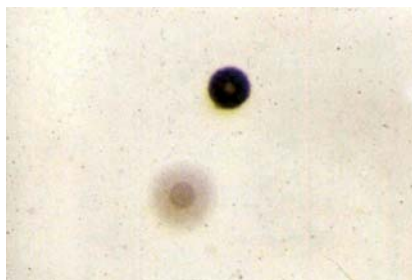


Figura 6. Colonias características de *Ureaplasma* spp. (color oscuro) y de *Mycoplasma hominis* ("huevo frito").

La identificación de *Ureaplasma* spp. y *M. hominis* en la práctica clínica, se puede realizar sin necesidad de otras pruebas o reactivos adicionales. La identificación completa a nivel de especie requiere otras pruebas como la PCR.

5.2.2.7. Criterios de interpretación de los resultados.

M. hominis y *Ureaplasma* spp. tienen una prevalencia elevada en la colonización del tracto genital de las personas sanas. Por esta razón es difícil valorar en cada situación su papel como patógenos.

Su aislamiento en cualquier cantidad de un líquido o tejido normalmente estéril, está significativamente asociado a enfermedad. Sin embargo, cuando la muestra se obtiene a través de o procede del tracto genital normalmente colonizado es necesaria la cuantificación. Los recuentos iguales o superiores a 10^4 UCC/ml en la uretra masculina se consideran significativos. Los recuentos elevados de *M. hominis* de 10^5 UCC/ml o superiores en la vagina, suelen asociarse a vaginosis bacteriana. Igualmente, la asociación altamente significativa de *Ureaplasma* spp. con parto pretérmino y endometritis, se relaciona con la presencia de recuentos $> 10^5$ UCC/ml en la vagina.

5.2.2.8. Procedimientos adicionales a realizar en situaciones especiales.

En los casos en que pueda tener relevancia clínica el aislamiento de micoplasmas genitales se procederá a la realización de pruebas de sensibilidad a los antibióticos. Para ello, es aconsejable que se almacenen alícuotas del caldo crecido (color naranja) a -70°C .

Se debe considerar la realización de diluciones seriadas en muestras especiales, o para evitar la acción de inhibidores, como se ha mencionado anteriormente.

En el estudio de prostatitis crónica, antes de la inoculación de las muestras se confirmará la presencia de células inflamatorias en el sedimento de la muestra de orina obtenida después del masaje prostático. Si a la observación microscópica entre porta y cubre (20x) no se observan ≥ 10 leucocitos por campo, no se continuará el estudio.

5.2.2.9. Información de los resultados.

Aunque habitualmente se suele informar del aislamiento de *U. urealyticum*, es más correcto y apropiado informar *Ureaplasma* spp., a menos que se puedan diferenciar las especies mediante PCR.

En los cultivos cuantitativos de *Ureaplasma* spp. (uretritis y prostatitis) y *M. hominis* se expresarán los títulos de crecimiento en UCC/ml o en UFC.

En los cultivos cualitativos (muestras de líquidos o tejidos estériles) bastará con expresar su aislamiento.

5.3. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO NO BASADO EN EL CULTIVO

5.3.1. Técnicas de detección de antígenos. Se han desarrollado varias técnicas comercializadas para la detección antigénica rápida de *M. pneumoniae*, como: inmunofluorescencia directa, contraelectroforesis, inmunoblot y

enzimoinmunoensayo (Ag-EIA) de captura de antígeno. La utilidad y aceptación de estas técnicas se ha visto limitada por su baja sensibilidad (60-68%) y especificidad, debida a la similitud antigénica entre *M. pneumoniae* y *M. genitalium* y a las reacciones cruzadas con otros micoplasmas. En la actualidad, la detección de antígenos ha sido ampliamente superada por métodos moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

De todas las técnicas, las más utilizada ha sido el enzimoinmunoensayo (Ag-EIA) Pneumofast Ag (Internacional Microbio. Signes, France).

5.3.2. Sondas de ADN. En la década de 1980 se desarrollaron técnicas de hibridación de ADN para el diagnóstico de la infección por *M. pneumoniae*. Se usaron ampliamente como dianas los genes del 16S ARNr y también las sondas consistentes en ADNr (GenProbe San Diego, Calif.) y una sonda de ADN marcada con I^{125} para una secuencia específica del ARNr de *M. pneumoniae*. Las sondas presentan la misma sensibilidad diagnóstica que la detección de antígenos, por lo que han sido sustituidas por la PCR, que además no utiliza isótopos radioactivos.

Ambas técnicas, detección de antígenos y detección por sondas, tienen un límite de detección de 10^3 - 10^4 UFC/ml. Considerando que la concentración de *M. pneumoniae* en las muestras de esputo de los pacientes infectados oscila entre 10^2 y 10^6 UFC/ml, las técnicas que no empleen amplificación de antígeno se encuentran en el límite de la sensibilidad y no deben ser recomendadas para el diagnóstico.

5.3.3. Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

5.3.3.1. Consideraciones generales sobre la aplicación de la técnica de PCR al diagnóstico de infecciones por micoplasmas

Extracción de ácidos nucleicos:

La técnica para la preparación de la muestra previa a cualquier PCR es un punto clave para obtener una buena sensibilidad. Se han usado protocolos muy diferentes para validar la PCR en su aplicación al diagnóstico de la infección por micoplasmas, desde técnicas manuales como hervir simplemente la muestra o el método de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, hasta totalmente automatizadas como el sistema MagNaPure LC de Roche Diagnostics.

Los fabricantes de equipos comerciales acostumbran a ser muy estrictos en lo que se refiere al procedimiento de amplificación, pero suelen limitarse a ofrecer unas recomendaciones generales de la técnica de extracción que debe usarse. Esto se debe a que en la práctica asistencial los laboratorios trabajan con un método único de extracción que sea válido para todas las PCR que se realizan, bien sea un método manual cuando el volumen de actividad es pequeño, o con un instrumento automatizado si es mayor. Los criterios para escoger un sistema u otro no dependen de una PCR en concreto sino que tienen en cuenta fundamentalmente razones económicas y de optimización del trabajo. Por tanto, habitualmente se utiliza la técnica de extracción de la

que se dispone en cada laboratorio, independientemente de lo que recomiende el fabricante de los equipos comerciales o de lo descrito por los diferentes autores.

Aunque las sensibilidades que reportan diferentes métodos de extracción pueden variar, todos los sistemas comercializados son válidos. Un factor que se debe controlar especialmente es el tipo de muestra con el que se va a trabajar. Hay equipos que están validados únicamente para plasma o suero, y sin embargo, el laboratorio puede utilizar una variedad de muestras que incluyen orina, exudados tomados en una torunda (genitales y de vías respiratorias altas) o muestras respiratorias como lavados nasofaríngeos. En general, las muestras líquidas se procesan sin ninguna preparación previa, y las torundas requieren una homogeneización en una solución tamponada como PBS. Como es habitual cuando se usa un dispositivo para aplicaciones diferentes a las previstas, es muy importante su puesta a punto y validación, que se debe realizar en cada laboratorio concreto.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

Los equipos comerciales deben tener la marca CE (*Conformité Européene*) según la normativa *Vitro Diagnostic Medical Devices Directive 98/79/EC* para poder ser usadas en el diagnóstico clínico en Europa.

Sin embargo, y según el artículo 1.5 de esta directiva, quedan excluidos de la misma aquellos dispositivos fabricados y usados tan solo en la misma institución de salud. Esto implica que las técnicas *in-house* pueden usarse con finalidades diagnósticas mientras no sean comercializadas, aunque en este caso se debe ser muy riguroso con los controles de calidad.

PCR en tiempo real:

Las técnicas de PCR en tiempo real son robustas, de realización muy sencilla y con un riesgo bajo de contaminación por amplicones. Suelen permitir la amplificación y detección simultánea de hasta cuatro dianas, por lo que suponen una aproximación muy atractiva en aquellos casos en que varios microorganismos pueden estar implicados en la misma patología, como la infección de transmisión sexual o la neumonía comunitaria. Por ello, en la actualidad la mayoría de los equipos se comercializan con esta tecnología.

Si se opta por una PCR-RT múltiple comercial, hay que asegurarse de que esta técnica está validada para el termociclador habilitado en cada laboratorio concreto, puesto que no todos los termocicladores son compatibles con los diferentes fluorocromos.

5.3.3.2. Micoplasmas genitales

5.3.3.2.1. Introducción. Las infecciones por *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *Ureaplasma* spp. (*Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*) y micoplasmas genitales (*M. hominis*, *M. genitalium*) son comunes tanto en hombres como en mujeres.

El papel patogénico de *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis* está bien establecido, pero el de las otras especies indicadas, o de su combinación,

puede ser controvertido puesto que también se encuentran formando parte de la microbiota normal.

Algunos de ellos, como *M. genitalium* y otros, tienen unos requerimientos especiales para su cultivo, y su investigación no se ha incluido en la sistemática de muchos laboratorios. Por ello, la verdadera incidencia y prevalencia de la infección por estos organismos no se conoce con exactitud.

La introducción de las técnicas de biología molecular, y en particular las de PCR en tiempo real (PCR-RT) comercializadas y con la marca CE, ha permitido realizar la identificación de estos agentes en la práctica asistencial. El diagnóstico etiológico debe incluir las diferentes posibilidades, y para simplificar el trabajo del laboratorio se suele usar una combinación de técnicas como PCR múltiple para varios microorganismos, o bien una combinación de PCR (*M. genitalium*, *C. trachomatis*) y cultivo (*N. gonorrhoeae*, *Ureaplasma* spp., *M. hominis*) o detección de antígeno (*C. trachomatis*).

5.3.3.2.2. *Recogida, medios de transporte y conservación de las muestras.* Puesto que la misma muestra clínica se usa para detectar diferentes microorganismos y para realizar diferentes técnicas, deben tenerse en cuenta las normas generales indicadas en el capítulo 5.2 “Diagnóstico microbiológico basado en el cultivo” de este procedimiento, y en los procedimientos de la SEIMC número 1a “Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras” y número 24 “Diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual y otras infecciones genitales”.

En el presente capítulo, tan solo se detallan aquellos aspectos que atañen específicamente al diagnóstico por PCR.

Tipos de muestra:

Numerosos estudios evalúan la sensibilidad de diferentes métodos genéticos en varios tipos de muestras. Cuando se trabaja con esta tecnología es importante destacar que la sistemática que se use para realizar la extracción de ácidos nucleicos es tan relevante como el tipo de muestra o la diana que se amplifica. La gran diversidad de técnicas de extracción disponibles, tanto manuales como automatizadas, y la falta de estudios comparativos que evalúen este factor hacen que sea difícil definir cual puede ser el espécimen óptimo.

La aceptación generalizada de la PCR como técnica de elección para diagnosticar infecciones por *C. trachomatis* utilizando el primer chorro de orina y la facilidad de su obtención, hacen que en la actualidad ésta sea una muestra muy usada en la práctica, junto con los clásicos exudados uretrales, vaginales o cervicales. A pesar de que no existe un acuerdo general sobre cual es la mejor muestra para detectar micoplasmas por PCR, el primer chorro de orina parece muy adecuado en hombres y ligeramente menos sensible que los exudados genitales en mujeres. En ellas, podría ser

recomendable el uso de más de un tipo de muestra (orina y exudado vaginal o endocervical), e incluso se ha propuesto que se pueden mezclar y procesar simultáneamente.

Recogida, y medios de transporte:

Primer chorro de orina:

- El paciente no debe haber orinado en las dos horas previas
- Sin lavado previo de la región genital, se han de recoger 5-10 ml del primer chorro de orina
- Es importante no diluir excesivamente el inóculo. Por ello, se debe interrumpir la micción y evitar la mezcla con el chorro medio.

Exudados:

- Si el fabricante de la técnica de PCR que se use recomienda un tipo específico de torunda o de medio de transporte, deberá dársele preferencia
- La mayoría de las torundas (algodón, dacrón) son aptas para las diferentes técnicas genéticas y convencionales.
- La mayoría de medios de transporte son aptos para las técnicas genéticas, e incluso se puede remitir la torunda en seco.
- El medio de transporte 2-SP es especialmente apropiado para investigación de *M. genitalium*.

Transporte y conservación de las muestras:

Si el fabricante de la técnica de PCR no especifica lo contrario, las muestras se pueden guardar a temperatura ambiente hasta 6 horas, y en nevera una semana.

5.3.3.2.3. *Reacción en cadena de la polimerasa*

Amplificación de dianas específicas:

Como se ha apuntado anteriormente, el diagnóstico debe incluir a varios agentes susceptibles de producir patología. A efectos prácticos, la amplificación de dianas individuales solo se suele realizar para *M. genitalium* en aquellos laboratorios que usan el cultivo para cubrir el diagnóstico de otros micoplasmas y ureaplasmas.

En la tabla 3 se facilitan los genes más usados según datos de la literatura como diana de técnicas de amplificación.

Tabla 3. Genes diana usados para detectar micoplasmas genitales por PCR

Microorganismo	Secuencia diana
<i>Mycoplasma</i> spp. y <i>Ureaplasma</i> spp.	Gen 16S ARNr
<i>M. genitalium</i>	Gen de la adhesina MgPa
<i>M. hominis</i>	Gen <i>gap</i> (<i>glycolytic enzyme glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>)
<i>U. urealyticum</i>	Gen <i>ureB</i> (<i>urease complex component</i>)

Debe tenerse en cuenta que la región genómica *MgPa* presenta una cierta variabilidad y, a pesar de que ha sido usada por varios autores para estandarizar PCRs diagnósticas usando cepas patrón, puede dar resultados falsamente negativos cuando se trabaja con cepas salvajes de muestras clínicas.

5.3.3.2.4. *Amplificación de varias dianas. PCR multiplex.* Una estrategia muy usada es la amplificación de la región genómica 16S ARNr común a varios microorganismos, y la posterior identificación de la especie por simple electroforesis o hibridación con sondas específicas en formato de placa de microtitulación.

Se han desarrollado varias técnicas de PCR en tiempo real (PCR-RT) desde que Yoshida y col.

publicaran el primer ensayo para *M. genitalium* en 2002. Actualmente se dispone de varios equipos comercializados, todos ellos incluyen un control interno para asegurar que no ha habido inhibición de la reacción, disponen de la marca CE y acostumbran a permitir la amplificación simultánea de varias dianas. Algunas de estas técnicas se indican en la tabla 4.

Tabla 4. Técnicas comerciales para detectar micoplasmas genitales por PCR-RT

Fabricante	Nombre de la técnica	Microorganismos
Sacace Biotechnologies	Ureaplasma species Real-TM	<i>Ureaplasma</i> spp.
	Chlamydia trachomatis/ Ureaplasma/ M. hominis Real-TM	<i>C. trachomatis</i> <i>U. parvum</i> <i>U. urealyticum</i> <i>M. hominis</i>
Seegene	Magicplex STI1 Real-time tests	<i>C. trachomatis</i> <i>N. gonorrhoeae</i> <i>M. genitalium</i> <i>M. hominis</i> <i>U. urealyticum</i>

La cuantificación (determinación de la carga bacteriana) es muy exacta con las técnicas en tiempo real. A pesar de que se desconoce la correlación que pueda tener con situaciones clínicas concretas, podría ser relevante en el conocimiento del papel patógeno de las diferentes especies de micoplasmas y ureaplasmas, y su diferenciación de microorganismos comensales.

5.3.3.3. *Mycoplasma pneumoniae*

5.3.3.3.1. *Introducción*

M. pneumoniae es un importante agente causal de neumonía adquirida en la comunidad, junto con otros microorganismos como *C. pneumoniae*, *Legionella* spp. y varios agentes víricos entre otros.

La mayoría de las infecciones son banales y quedan sin diagnóstico etiológico, pero en caso de que se desee, la PCR permite realizarlo en las fases precoces del proceso infeccioso. La facilidad de uso de la PCR-RT y la existencia de equipos comerciales ha contribuido a su introducción en la sistemática de muchos laboratorios y cada vez es más usada, incluso en estudios epidemiológicos poblacionales que se basaban tradicionalmente en la serología.

5.3.3.3.2. *Recogida, medios de transporte y conservación de las muestras*

Consideraciones generales:

Es frecuente que la misma muestra se use para descartar infecciones por otros agentes diferentes a *M. pneumoniae*. Por ello, deberán tenerse en cuenta las normas especificadas en los procedimientos en Microbiología de la SEIMC número 1 a "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras" y número 25 "Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior".

Tipos de muestra:

La poca severidad de la enfermedad usualmente no justifica la obtención de muestras de tracto respiratorio inferior como lavados

broncoalveolares, o biopsias pulmonares con procedimientos invasivos, aunque han sido usados con éxito. Las muestras más habituales incluyen exudados nasofaríngeos u orofaríngeos tomados con torunda, o lavados nasofaríngeos, y parecen tener una sensibilidad similar.

Aunque las diferentes técnicas de PCR no están validadas en muestras extrapulmonares, la detección de *M. pneumoniae* también es posible en fluidos corporales como sangre o LCR, lo que permite diagnosticar una variedad de síndromes extrapulmonares.

Recogida y medios de transporte:

No debe tenerse ninguna precaución especial en la recogida de muestras respiratorias, exceptuando cuando el fabricante recomiende especialmente algún tipo de sistema. La mayoría de torundas disponibles en el mercado (dacrón, algodón) son aptas. Previamente a la extracción, se homogeneizarán en una pequeña cantidad de solución tamponada (1-2 ml de tampón PBS), al igual que las muestras respiratorias líquidas (lavados nasofaríngeos) que sean muy viscosas.

Las muestras de sangre deberán recogerse en tubos de 5-10 ml con anticoagulante EDTA. La sangre recogida con heparina o de pacientes heparinizados puede inhibir la PCR, por lo que no deberá usarse.

Los líquidos cefalorraquídeos se toman en recipiente estéril. No está establecido claramente cual es el volumen mínimo necesario para obtener una buena sensibilidad, pero en general se acepta que con 200 microlitros puede ser suficiente.

Transporte y conservación:

Al igual que lo especificado en el apartado de micoplasmas genitales, las muestras se pueden guardar a temperatura ambiente hasta 6 horas y en nevera una semana, sin pérdida apreciable de la sensibilidad.

5.3.3.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa

M. pneumoniae es una especie muy homogénea desde el punto de vista genético. Sin embargo, se han descrito hasta cinco subtipos con diferencias en los elementos repetitivos localizados en la región P1 de la adhesina. Esta diana es la escogida para la mayoría de las técnicas de PCR tanto caseras como comerciales, pero está demostrado que se pueden detectar todas las variedades. Otras dianas son el gen 16S ARNr, el gen ATPase *operon gene*, el gen *tuf* o el elemento repetitivo repMp1 y recientemente el gen que codifica la toxina CARDS.

Aunque hay pocos estudios, la carga bacteriana determinada por PCR-RT se ha asociado significativamente con mayor gravedad clínica, por lo que informar los resultados de forma cuantitativa puede tener un valor pronóstico y no meramente diagnóstico.

En la tabla 5 se detallan las principales características de algunas técnicas comerciales en tiempo real. Como es habitual, todas ellas tienen control interno, son cuantitativas y disponen de la marca CE.

En el mercado también se pueden encontrar equipos comercializados que permiten la detección simultánea de diferentes patógenos respiratorios, por PCR convencional y en tiempo real.

Mención especial merece un sistema comercializado por Idaho technologies (Salk Lake City, USA) que combina la preparación de la muestra con transcripción reversa, PCR en tiempo real y detección por curvas de semifusión de alta resolución. Se trata de un dispositivo totalmente automatizado, con un trabajo técnico mínimo, que permite detectar en una hora la presencia de múltiples microorganismos patógenos para el sistema respiratorio, tanto víricos como bacterianos. La preparación de la técnica es realmente muy sencilla y se puede asumir por personal con poca experiencia en técnicas genéticas. Inconvenientes del sistema son su precio elevado y que la parte de la muestra que se usa para esta técnica ya no está disponible para otras PCR, lo que puede ser un problema si la cantidad de la que se dispone es escasa. Pensamos que la agilidad en el diagnóstico que supone que lo pueda realizar el personal de guardia condicionará que en breve se comercialicen técnicas similares a precios más asequibles. En la tabla 6 se indican algunas de estas técnicas de PCR para detectar simultáneamente múltiples microorganismos.

5.3.3.3.4. Interpretación e informe de los resultados

Los resultados podrán informarse en forma cualitativa o bien cuantificados en valores de copias bacterianas por mililitro de muestra tal como se indica en la tabla 7.

5.3.3.3.5. Limitaciones del procedimiento

- Con el diagnóstico mediante técnicas genéticas no se dispondrá de la cepa bacteriana, por lo

que no se podrán realizar fácilmente estudios de sensibilidad ni de tipado.

- La sensibilidad puede disminuir cuando hay poco volumen de muestra, como es frecuente que ocurra en líquidos cefalorraquídeos, o cuando el inóculo bacteriano ha sido diluido, por ejemplo al mezclar el primer chorro de orina con la parte media de la micción.
- Los resultados falsamente positivos por contaminación por amplicones son poco frecuentes con PCR-RT, aunque no pueden ser descartados.
- Cuando no amplifica ni el ADN diana del microorganismo que se quiere estudiar ni el control interno, indica una inhibición de la polimerasa, posiblemente por acción de alguna sustancia presente en la muestra clínica. Ante esta situación, se puede volver a hacer extracción de la muestra con otra técnica que purifique mejor, o simplemente diluir el extraído con el mismo volumen de agua. Si al repetir la PCR amplifica o bien la diana o bien el control interno, se puede validar el resultado. En caso contrario, hay que recomendar que se envíe una nueva muestra, si esto es posible.
- La fluorescencia que se detecta en ciclos tardíos puede ser debida a inestabilidad del fluorocromo que marca la sonda, por lo que estos resultados deben ser comprobados.
- Se desconoce la correlación clínica que pueden tener los resultados cuantitativos obtenidos por PCR-RT. No existen guías respecto al valor umbral a partir del cual se puede hacer una interpretación pronóstica o de otro tipo, por lo que cada laboratorio debe basarse en su experiencia.
- La comparación de los resultados con los de otros laboratorios que utilicen la misma técnica de PCR solo podrá hacerse si cada laboratorio se asegura trabajar con el mismo tipo de muestra y el mismo protocolo de extracción de ácidos nucleicos.

5.3.4. Espectroscopía RAMAN combinada con nanobastones de plata (NA-SERS).

La espectroscopía RAMAN se basa en el análisis espectral de la composición molecular completa (*chemical make-up*) de la bacteria. Se realiza mediante un microscopio confocal con múltiples longitudes de onda, haciendo incidir un rayo laser de 785-nm que a medida que se dispersa sobre la muestra se hace cercano a los rayos infrarrojos y detecta formas espectrales de las bacterias. La aplicación de una plataforma de nanobastones de plata tiene como misión realzar o reforzar la señal del rayo RAMAN en la proximidad de la superficie de metal (Espectroscopía RAMAN realzada superficial, NA-SERS), con lo que se consigue un aumento significativo de la intensidad espectral, sin pérdida de la especificidad y obtención de las huellas moleculares.

Tabla 5. Técnicas de PCR-RT para detectar *M.pneumoniae*.

Equipo	Fabricante	Técnica de PCR-RT	Diana
Nanogen <i>M. pneumo.</i> Q-PCR Alert kit	Nanogen advanced diagnostics	PCR-RT con sondas TaqMan	Adhesina P1
Simplexa <i>Mycoplasma pneumoniae</i> kit	Focus diagnostics	PCR-RT con sondas TaqMan	Adhesina P1
Cepheid <i>Mycoplasma pneumoniae</i> ASR kit	Cepheid	PCR-RT con sondas TaqMan	Adhesina P1
Venor Mp-Qp PCR detection kit	Minerva biolabs	PCR-RT con sondas TaqMan	Adhesina P1
Artus <i>M.pneumoniae</i> LC PCR kit RUo	Qiagen	PCR-RT con sondas molecular beacons	Elemento repetitivo repMp1

Tabla 6. Algunas técnicas de PCR para detectar *M. pneumoniae* y otros agentes de neumonía comunitaria

Equipo	Fabricante	Técnica de PCR	Microorganismos
Seplex PneumoBacter ACE Detection	Seegene	PCR convencional y detección por electroforesis capilar	<i>S. pneumoniae</i> <i>L. pneumophila</i> <i>H. influenzae</i> <i>B. pertussis</i> <i>C. pneumoniae</i> <i>M. pneumoniae</i>
Diagenode <i>Mycoplasma pneumoniae/Chlamydomphila pneumoniae</i>	Diagenode	PCR-RT con sondas TaqMan	<i>C. pneumoniae</i> <i>M. pneumoniae</i>
Filmarray respiratory panel	Idaho technologies	Preparación de muestra, retrotranscripción, PCR-RT, detección por curvas de semifusión	Adenovirus Metapneumovirus Bocavirus Respiratorio sincitial Coronavirus Rhinovirus Enterovirus <i>B. pertussis</i> Influenza <i>C. pneumoniae</i> Parainfluenza <i>M. pneumoniae</i>

Tabla 7. Informe de los resultados cualitativos de la PCR

Resultado	PCR para el microorganismo estudiado	PCR para el control interno
Negativo	Negativo	Positivo
Positivo	Positivo	Positivo
	Positivo	Negativo
No valorable	Negativo	Negativo

Recientemente, la aplicación de la NA-SERS a la detección de *M. pneumoniae* en muestras artificialmente contaminadas con el microorganismo y a muestras clínicas de pacientes diagnosticados por PCR, ha proporcionado unos excelentes resultados alcanzando una sensibilidad del 97% y abriendo nuevas y prometedoras perspectivas diagnósticas.

Igualmente, la espectroscopia RAMAN ha demostrado ser una herramienta excepcional para la discriminación entre cepas de *M. pneumoniae*, con especificidad próxima al 100%, muy superior a la clásica determinación de los subtipos de la proteína P1.

5.3.5. Detección mediante tecnología PLEX-ID. La tecnología PLEX-ID (Abbott), combina la extracción y amplificación por PCR de regiones genómicas muy conservadas de los microorganismos con la

espectrometría de masas con ionización por electrospray. La aplicación de esta metodología al diagnóstico microbiológico ofrece la posibilidad de caracterizar y detectar los microorganismos en las muestras clínicas de forma rápida y especificidad y sensibilidad muy elevadas. *M. pneumoniae*, está incluido en el amplio abanico de microorganismos detectables, lo que proporciona nuevas y atractivas posibilidades diagnósticas para el futuro.

6. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS

6.1. INTRODUCCIÓN

Los micoplasmas son sensibles en general a las tetraciclinas, macrólidos, lincosamidas, estreptograminas, fluoroquinolonas, aminoglucósidos, cloranfenicol y linezolid. Típicas excepciones de resistencia natural son *M.*

pneumoniae y *Ureaplasma* spp. a las lincosamidas y *M. hominis* a los macrólidos.

Por otra parte, el patrón de sensibilidad de *M. genitalium* es similar al de *M. pneumoniae*, mientras que el de *M. fermentans* es similar al de *M. hominis*.

Dado que la sensibilidad de *M. pneumoniae* a los macrólidos, tetraciclinas y fluoroquinolonas se mantiene constante no está indicada la realización de pruebas de sensibilidad en esta especie. La aparición en Japón en 2001 de cepas con resistencia a los macrólidos por mutación genética en el 23S ARNr, podría hacer cambiar esta actitud.

Ureaplasma spp. y *M. hominis* pueden presentar resistencia a las tetraciclinas mediada por el transposón *tetM*, en relación con ciertas áreas geográficas, grupos de población y exposición previa a este antibiótico. En los procesos causados por estos micoplasmas está indicada la realización de pruebas de sensibilidad, como también lo está en los pacientes, en especial inmunocomprometidos, con artritis causada por micoplasmas genitales, en los que no es infrecuente la infección por cepas multiresistentes.

Las nuevas quinolonas son muy activas frente a todas las especies humanas, aunque también se han descrito resistencias en *M. hominis* por alteraciones en la ADN girasa y en la topoisomerasa IV.

Hasta el momento actual, no existen métodos estandarizados para la realización de pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antibióticos de los micoplasmas humanos. Sin embargo, se espera que antes de finalizar el año 2011 el CLSI (*Clinical and Laboratory Standard Institute*) publique las directrices para la realización e interpretación de las pruebas de sensibilidad frente a estos microorganismos, como culminación de los estudios que viene desarrollando desde 2001 junto al *Subcommittee on Mycoplasma Antimicrobial Susceptibility Testing*.

La realización de pruebas de sensibilidad frente a los antimicrobianos en los aislados de micoplasmas humanos es una tarea laboriosa y sometida a múltiples factores:

- No hay medio de cultivo ni pH únicos estandarizados, ya que cada especie de micoplasma difiere en sus requerimientos (*Ureaplasma* spp., pH 6,0-6,5; *M. pneumoniae* y *M. hominis*, pH 7,4).
- Por otra parte, el pH puede afectar la actividad de los antibióticos y es un factor crítico en la interpretación de los resultados.
- La incubación con CO₂ puede afectar al pH y a la CMI.
- El tiempo de crecimiento de la especie de micoplasma. Así, el método de difusión con disco en agar no es recomendable para *M. pneumoniae* y otras especies de crecimiento lento, por la difusión del antibiótico en el agar antes de que el crecimiento del micoplasma sea visible y por la falta de correlación de los diámetros con las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI).

En cuanto al inóculo apropiado, el consenso general es de 10⁴-10⁵ UCC/ml.

6.2. TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

6.2.1. Microdilución en caldo (test de inhibición metabólica). A los pocillos de una placa de microtitulación en los que se han realizado diluciones dobles seriadas del antibiótico en el caldo de cultivo, se añade un inóculo constante de la cepa a ensayar. Proporciona una CMI cuantitativa basada en la inhibición del cambio de color del medio (inhibición del crecimiento) por falta de metabolización del sustrato debido al efecto del antibiótico. La CMI corresponde a la concentración más baja de antibiótico que inhibe el crecimiento del microorganismo. Es la técnica más ampliamente utilizada, permite la determinación simultánea de varios antimicrobianos en la misma placa y la determinación del efecto bactericida.

6.2.2. Equipos comerciales. Consisten en galerías con micropocillos que contienen antimicrobianos liofilizados, generalmente, en dos o más concentraciones que corresponden a los puntos de corte propuestos para la clasificación del aislado como sensible, intermedio y resistente. La lectura de la prueba también se basa en la presencia/ausencia de cambio del color del medio de cultivo. Algunos de estos equipos incorporan también el crecimiento del organismo y su identificación. Cuando se emplean inóculos definidos, proporcionan resultados comparables a los obtenidos mediante la CMI. Entre los equipos disponibles en el mercado se encuentran: Mycoplasma IST (bioMérieux), Mycoplasma SIR (Bio-Rad), Mycofast "All-In" (Internacional Microbio) y MYCOKIT-ATB (PBS Organics).

6.2.3. Determinación de la CMI por dilución en agar. Utiliza una batería de placas de agar que contienen concentraciones apropiadas de antibióticos en las que se inoculan múltiples cepas de micoplasmas mediante un replicador o un asa que deposite sobre el agar un volumen de 10 µl de cada cepa a estudiar, de forma que se obtengan entre 30 a 300 colonias por cada botón de inóculo. La CMI corresponde a la concentración más baja de antibiótico que inhiba la formación de colonias en el mismo momento en que se observa crecimiento en la placa de control sin antibiótico.

Esta técnica, muy adecuada para determinar simultáneamente la CMI de varias cepas, no es aconsejable para un pequeño número de cepas o un solo aislado.

6.2.4. E-test. La determinación de la CMI mediante la prueba de difusión en gradiente (E-test) produce resultados comparables a los obtenidos mediante las pruebas de microdilución en caldo y dilución en agar, tanto con *M. hominis* como con *Ureaplasma* spp. Ofrece ventajas sobre las técnicas anteriores, como su mayor simplicidad, punto final de lectura más estable, menor efecto inóculo y su aplicabilidad a un solo aislado.

El inóculo adecuado es un volumen de 0,5 ml de una suspensión que contenga 10⁵ UCC/ml. Una vez distribuido el inóculo homogéneamente y dejando

secar la superficie del agar (15 minutos), se deposita la tira de E-test. La lectura se realiza cuando mediante el microscopio estereoscópico se observe el crecimiento de colonias y la formación de una elipse alrededor de la tira. La CMI es el número en la escala indicada en la tira que corresponde a la intersección con el crecimiento.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Beersma MF, Dirven K, van Dam AP, Templeton KE, Claas EC, Goossens H. Evaluation of 12 commercial tests and the complement fixation test for *Mycoplasma pneumoniae*-specific immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies, with PCR used as the "gold standard". *J Clin Microbiol* 2005; 43:2277-2285.
2. Cassell GH, Waites KB, Watson HL, Crouse DT, Harasawa R. *Ureaplasma urealyticum* intrauterine infection: role in prematurity and disease in newborn. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6:69-87.
3. Daxboeck F, Krause R, Wenisch C. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9:263-273.
4. Dumke R, Jacobs E. Comparison of commercial and in-house real-time PCR assays used for detection of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2009; 47:441-444.
5. Echevarria JM, Leon P, Balfagon P, López JA, Fernandez MV. Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections by microparticle agglutination and antibody-capture enzyme-immunoassay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 9:217-220.
6. Gaydos Ch, 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. *Sex Transm Dis* 2009; 36:598-606.
7. Hennigan SL, Driskell JD, Dluhy RA, Zhao Y, Tripp RA, Waites KB, Krause DC. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in simulated and true clinical throat swab specimens by nanorod array-surface-enhanced Raman spectroscopy. *PLoS ONE* 2010; 5:1:e13633.
8. Horner PJ; Thomas B, Gilroy CB, et al. Role of *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* in acute and chronic nongonococcal urethritis. *Clin Infect Dis* 2001; 32:995-1003.
9. Kannan TR, Baseman JB. ADP-ribosylating and vacuolating cytotoxin of *Mycoplasma pneumoniae* represents unique virulence determinant among bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103:6724-6729.
10. Kenyon S, Boulvain M, Neilson J. Antibiotics for preterm rupture of membranes. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; (2): CD001058.
11. Larsen B, Hwang J. *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, and adverse pregnancy outcomes: a fresh look. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2010; PMID: 20706675 (PubMed – indexed), pii: 521921. Epub Jul 12.
12. Loens K, Goossens H, Ieven M. Acute respiratory infection due to *Mycoplasma pneumoniae*: current status of diagnostic methods. *Eur J Clin Microbiol Dis* 2010; 29:1055-1069.
13. Mabanta CG, Pryhuber GS, Weinberg GA, Phelps DL. Erythromycin for the prevention of chronic lung disease in intubated preterm infants at risk for, or colonized or infected with *Ureaplasma urealyticum*. *Cochrane Database Syst Rev* 2003;4:CD003744.
14. Madoff S, Hooper DC. Nongenitourinary infections caused by *Mycoplasma hominis* in adults. *Rev Infect Dis* 1988; 10:602-613.
15. Meseguer MA, Álvarez A, Rejas MT, Sánchez C, Pérez-Díaz JC, Baquero F. *Mycoplasma pneumoniae*: a reduced-genome intracellular bacterial pathogen. *Infect Genet Evol* 2003;3:47-55.
16. Muir MT, Cohn SM, Loudon C, Kannan TR, Baseman JB. Novel toxin assays implicate *Mycoplasma pneumoniae* in prolonged ventilator course and hypoxemia. *Chest* 2011;139:305-310.
17. Narita M. Pathogenesis of neurologic manifestations of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Pediatr Neurol* 2009; 41:159-166.
18. Narita M. Pathogenesis of extrapulmonary manifestations of *Mycoplasma pneumoniae* infection with special reference to pneumonia. *J Infect Chemother* 2010; 16:162-169.
19. Nilsson AC, Björkman P, Welinder-Olsson CW, Windell A, Persson K. Clinical severity of *Mycoplasma pneumoniae* (MP) infection is associated with bacterial load in orofaringeal secretions but not with MP genotype. *BMC Infectious Diseases* 2010; 10:39-46.
20. Prescott Atkinson T, Balish MF, Waites KB. Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *FEMS Microbiol Rev* 2008; 32:956-973.
21. Somarajan SR, Thirumalai R, Kannan TR, and Baseman JB. *Mycoplasma pneumoniae* Mpn133 is a cytotoxic nuclease with a glutamic acid-, lysine- and serine-rich region essential for binding and internalization but not enzymatic activity. *Cellular Microbiology* 2010; 12:1821-1831.
22. Talkington DF, Shott S, Fallon MT, Schwartz SB, Thacker WL. Analysis of eight commercial enzyme immunoassay tests for detection of antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* in human serum. *Clin Diag Lab Immunol*. 2004; 11:862-867.
23. Taylor-Robinson D, Lamont RF. Mycoplasmas in pregnancy. *Int J Obstet Gynaecol (BJOG)* 2011; 118:164-174.
24. Templeton KE, Scheltinga SA, Graffelman AW, Van Schie JM, Crielaard JW, Sillekens P, Van Den Broek PJ, Goossens H, Beersma MF, Claas EC. Comparison and evaluation of real-time PCR, real-time nucleic sequence-based amplification, conventional PCR and serology for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2003; 41:4366-4371.
25. Tita ATN, Andrews WW. Diagnosis and management of clinical chorioamnionitis. *Clin Perinatol* 2010;37:339-354.
26. Viscardi RM. *Ureaplasma* species: role in diseases of prematurity. *Clin Perinatol* 2010; 37:393-409.
27. Viscardi RM, Hasday JD. Role of *Ureaplasma* species in neonatal chronic lung disease: epidemiologic and experimental evidence. *Pediatr Res* 2009; 65:84R-90R.
28. Waites KB, Balish MF, Precott Atkinson T. New insights into the pathogenesis and detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Future Microbiol* 2008; 3:635-648.
29. Waites KB, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17:697-728.
30. Waites KB, Bébéar CM, Robertson JA, Talkington DF, Kenny GE. Laboratory diagnosis of mycoplasmal infections. *Cumitech* 34, Washington DC; ASM Press 2001.
31. Waites KB, Schelonka RL, Xiao LI, Grigsby PL, Novy MJ. Congenital and opportunistic infections: *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis*. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 2009; 14:190-199.
32. Welti M, Jatón K, Altwegg M, Sahli R, Wenger A, Bille J. Development of a multiplex real-time quantitative PCR assay to detect *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* and *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract secretions. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 45:85-95.

33. 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; 41:1850-1855.
34. Yoshida T, Deguchi T, Ito M, Maeda S, Tamaki M, Ishiko H. Quantitative detection of *Mycoplasma genitalium* from first-pass urine of men with urethritis and asymptomatic men by real-time PCR. J Clin Microbiol 2002; 40:1451-1455.

DOCUMENTO TÉCNICO

PNT-M-01
DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA NEUMONÍA POR *Mycoplasma pneumoniae*
MEDIANTE LA TÉCNICA DE AGLUTINACIÓN DE PARTÍCULAS SENSIBILIZADAS

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico serológico de la neumonía por <i>Mycoplasma pneumoniae</i> mediante la técnica de aglutinación de partículas sensibilizadas	PNT-M-01	
		Edición Nº 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología básica para la determinación de anticuerpos frente a *Mycoplasma pneumoniae*.

Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de microbiología clínica que realicen diagnóstico etiológico de las neumonías.

2. FUNDAMENTO

Mycoplasma pneumoniae es una bacteria sin pared celular de difícil cultivo y aislamiento a partir de muestras clínicas. Se trata de uno de los agentes clásicos de la neumonía atípica adquirida en la comunidad, que ocasiona entre el 20 y el 30% de las neumonías extrahospitalarias. Afecta especialmente a niños, adolescentes y adultos jóvenes.

La prueba de aglutinación de partículas de gelatina es un test fabricado en base a la sensibilización de estas partículas con componentes de la membrana externa de *M. pneumoniae* (cepa Mac). En presencia de anticuerpos específicos se produce la aglutinación de estas partículas.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento de recogida y procesamiento de muestras. SEIMC 2003. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>
- Normas de bioseguridad
- Gestión de residuos

4. MUESTRAS

La muestra adecuada es el suero. Las condiciones para la recogida y el transporte del suero deben contemplar:

- Centrifugar el tubo de sangre a 1000-1500g (generalmente equivale a 2000-2500 rpm) durante 10 minutos.
- En condiciones habituales se debe transferir el suero a tubos con tapón de rosca de 5 ml de capacidad y evitar mantenerlos a temperatura ambiente durante más de 24 horas.
- Identificar correctamente el tubo (nombre y/o número historia del paciente, referencia en origen y fecha de extracción).
- Para minimizar las contaminaciones microbianas que podrían alterar las muestras se recomienda no prolongar la conservación a 4°C más allá de 72 h. Si la determinación se difiere a fechas posteriores o se almacenan las muestras para archivo se recomienda la congelación que debe ser a -70°C para períodos prolongados.
- Inactivar las muestras al baño maría (56⁰±1°C) durante 30 minutos, la primera vez que se procesa la muestra. En caso de repetición basta inactivar 10 minutos.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Reactivo

SERODIA-MYCO-II

Referencia. MB-1419 (Fujirebio Inc)

Preparación

- Partículas sensibilizadas: reconstituir con 1,5 mL de diluyente de muestras
- Partículas no sensibilizadas: reconstituir con 0,5 mL de diluyente de muestras

Conservación

El reactivo reconstituido es estable (en nevera) hasta la caducidad del lote.

6. APARATOS Y MATERIAL

- Placas de microtitulación con fondo en U
- Cámara húmeda
- Pipetas serológicas
- Puntas de pipeta
- Agitador de placas de microtitulación

7. PROCEDIMIENTO

- En la placa de microtitulación identificar las filas para control positivo, y los números de las muestras a testar.
- Dispensar 100 µL de diluyente en el primer pocillo de cada fila, y 25 µL en los restantes.
- Dispensar 25 µL de la muestra de suero en el primer pocillo, mezclar y transferir 25 µL al pocillo siguiente. Repetir la operación hasta el último pocillo, descartando el último pase.
- Dispensar 50 µL del control positivo en el segundo pocillo de su fila y proceder igual que las muestras.
- Dispensar 25 µL de **PARTÍCULAS NO SENSIBILIZADAS** en el segundo pocillo de cada fila. Este será el control de aglutinación inespecífica (control negativo).
- Dispensar 25 µL de **PARTÍCULAS SENSIBILIZADAS** en los pocillos restantes (salvo el primer pocillo)
- Agitar BIEN la placa en agitador de placas de microtitulación durante 3 minutos
- Incubar en cámara húmeda a temperatura ambiente
- Se puede realizar una primera lectura a las 3 horas, y si es preciso repetir a las 24 horas.
- Ver esquema dispensación adjunto en anexo 1

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Se considera la reacción positiva si se observa un velo homogéneo de partículas en el pocillo.

Se considera la reacción negativa si se observan las partículas precipitadas en el fondo formando un punto de color rosado.

La expresión de los resultados se realiza en título de diluciones, siendo la mínima aglutinación determinada 1/40 (ver esquema del anexo 1)

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista

Servicio de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico serológico de la neumonía por <i>Mycoplasma pneumoniae</i> mediante la técnica de aglutinación de partículas sensibilizadas	PNT-M-01	
		Edición Nº 01	Página 3 de 4

responsable del Laboratorio de Microbiología que los emite.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Las limitaciones que se presentan con estas pruebas son similares a los de otras pruebas de diagnóstico serológico.

Si el resultado obtenido en la primera muestra es negativo o no concluyente, se recomienda repetir la determinación con una segunda muestra de suero obtenida 3 semanas después (fase de convalecencia).

En niños, adolescentes y adultos jóvenes, si la sospecha de neumonía por micoplasma es elevada, puede realizarse la segunda prueba en 2-3 días.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Echevarría JM, León P, Balfagon P, López JA, Fernández MV. Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections by microparticle agglutination and antibody-capture enzyme-immunoassay. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1990; 9:217-220.
2. Templeton KE, Scheltinga SA, Graffelman AW, Van Schie JM, Crielaard JW, Sillekens P, Van Den Broek PJ, Goossens H, Beersma MF, Claas EC. Comparison and evaluation of real-time PCR, real-time nucleic sequence-based amplification, conventional PCR and serology for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae*. J Clin Microbiol 2003; 41:4366-4371.
3. Waites KB, Bébéar CM, Robertson JA, Talkington DF, Kenny GE. Laboratory diagnosis of micoplasmatal infections. Cumitech 34, Washigton DC; ASM Press 2001.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico serológico de la neumonía por <i>Mycoplasma pneumoniae</i> mediante la técnica de aglutinación de partículas sensibilizadas	PNT-M-01	
		Edición Nº 01	Página 4 de 4

ANEXO 1.

ESQUEMA DE TRABAJO (MUESTRAS)

Nº POCILLO	1	2	3	4	5	6
DILUYENTE DE MUESTRA(µL)	100	25	25	25	25	25
MUESTRA(µL)	25→	25→	25→	25→	25→	25
DILUCIÓN MUESTRA	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160
PARTICULAS NO SENSIBILIZADAS(µL)		25				
PARTICULAS SENSIBILIZADAS(µL)			25	25	25	25
DILUCIÓN FINAL		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320

ESQUEMA DE TRABAJO (CONTROL POSITIVO)

Nº POCILLO	1	2	3	4	5	6
DILUYENTE DE MUESTRA(µL)			25	25	25	25
MUESTRA(µL)		50	25→	25→	25→	25
DILUCIÓN MUESTRA		1:10	1:20	1:40	1:80	1:160
PARTICULAS NO SENSIBILIZADAS(µL)		25				
PARTICULAS SENSIBILIZADAS(µL)			25	25	25	25
DILUCIÓN FINAL		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320

PNT-M-02
PROCESAMIENTO MICROBIOLÓGICO DE LAS MUESTRAS RESPIRATORIAS Y DE OTRAS LOCALIZACIONES PARA CULTIVO DE *Mycoplasma pneumoniae*

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Procesamiento microbiológico de las muestras respiratorias y de otras localizaciones para cultivo de <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	PNT-M-02	
		Edición N° 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Describir la metodología básica para el cultivo de *Mycoplasma pneumoniae* a partir de muestras respiratorias y de otras muestras de procedencia extrapulmonar.

2. FUNDAMENTO

Mycoplasma pneumoniae es un patógeno reconocido del tracto respiratorio y el segundo agente etiológico de la neumonía adquirida en la comunidad (20-30%). Además, la infección por *M. pneumoniae* se acompaña en ocasiones de manifestaciones extrapulmonares que incluyen cuadros neurológicos (encefalitis, meningitis mielititis), cutáneos, pericarditis, anemia hemolítica, artritis, etc., habiéndose aislado el microorganismo del líquido cefalorraquídeo, pericárdico, sinovial y de vesículas cutáneas.

M. pneumoniae es un organismo de crecimiento extremadamente fastidioso, que requiere para su cultivo medios complejos que le aporten los esteroides, aminoácidos y precursores de ácidos nucleicos que no es capaz de sintetizar.

La detección del crecimiento se basa en su capacidad para metabolizar la glucosa con formación de ácido láctico. La acidez provoca una bajada del pH del medio de cultivo, que se manifiesta por un cambio del color (del rojo al amarillo).

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento de recogida y procesamiento de muestras. SEIMC 2003. Disponible en:

<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

- Normas de bioseguridad
- Gestión de residuos

4. MUESTRAS

Las muestras respiratorias incluyen: exudado faríngeo, esputo, broncoaspirado, lavado broncoalveolar cepillado bronquial y tejido pulmonar.

Las muestras extrapulmonares incluyen: LCR, líquido/tejido pericárdico, líquido articular, líquido de aspiración de vesículas cutáneas.

- Las muestras faríngeas se recogerán mediante frotado vigoroso con torunda de alginato cálcico, dacrón o poliéster y vástago de aluminio o plástico (nunca de algodón, ni vástago de madera, por su efecto inhibitorio). Se introducirán en medio de transporte (ver apartado 5 de este PNT), si se demora la inoculación.
- Los esputos y demás muestras respiratorias, no requieren medio de transporte.
- Los líquidos orgánicos no requieren medio de transporte. Se centrifugarán entre 600-1000 rpm durante 15 minutos.
- Los tejidos se introducirán en medio de transporte (ver apartado 5), si se demora la inoculación. Se cortarían con bisturí en pequeñas piezas (nunca homogeneizar).

- Todas las muestras requieren un transporte inmediato al laboratorio.

5. MEDIOS DE CULTIVO

Caldo SP-4 (Tully y Whitcomb, 1979).

Medio base

PPLO broth s/n cristal violeta (Difco).....3,5 g
Bacto Tryptone (Difco).....1 g
Bacto Peptone (Difco).....5 g
Glucosa.....0,5 g
Agua destilada.....74 ml
Autoclavar a 121 °C, 15 minutos. Enfriar a 45 °C y añadir los suplementos.

Suplementos

CMRL 1066.....5 ml
Yeastolato (2%).....10 ml
Extracto fresco de levadura (25%).....3,5 ml
L-Glutamina.....0,3 ml
Suero bovino fetal.....17 ml
Ampicilina.....0,5 ml
Rojo fenol (0,2%).....1 ml
Ajustar el pH (con bicarbonato sódico) a 7-7,5
Alicuotar en tubos con 1,8 ml de medio y congelar a -20°C hasta su uso.

Agar SP-4

Igual composición que el Caldo SP-4 más
Agar Noble (Difco).....15 g
Conservar a 4 °C.

Medio de transporte

PPLO broth s/n cristal violeta (Difco).....3,5 g
Agua destilada.....70 ml
Autoclavar a 121 °C, 15 minutos. Enfriar a 45 °C y añadir los suplementos.

Suplementos

Suero de caballo.....20 ml
Extracto fresco de levadura (25%).....10 ml
Rojo fenol (0,2%).....1 ml
Ajustar el pH (con bicarbonato sódico) a 7.0
Cefazolina (2.500 µl/ml).....2 ml
Ticarcilina (100 mg/ml).....1 ml
Alicuotar 2 ml en tubos y conservar a -20 °C

- Descongelar en un baño a 36°C los tubos con medio SP-4 o medio de transporte necesarios, antes de inocular las muestras. Identificar los tubos (número de registro y fecha) y numerarlos.
- Identificar las placas de agar (número de registro y fecha).

6. APARATOS Y MATERIAL

Pipetas
Puntas de pipeta
Jarra de incubación
Tubos estériles de plástico
Placas de Petri de plástico estériles pequeñas
Agitador tipo vortex
Sobres generadores de CO₂
Microscopio estereoscópico

Servicio de Microbiología Hospital.....	Procesamiento microbiológico de las muestras respiratorias y de otras localizaciones para cultivo de <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	PNT-M-02	
		Edición N° 01	Página 3 de 4

Estufa de 35-37°C
Baño maría
Autoclave

7. PROCEDIMIENTO

7.1. INOCULACIÓN EN CALDO SP-4

A) Torundas (exudado faríngeo)

- Introducir la torunda en el tubo con 1,8 ml de medio, girándola en el interior y luego exprimirla contra las paredes del tubo para desecharla.
- Tomar 200 µl con la pipeta y transferirlos al 2º tubo (dilución 10⁻²). Mezclar varias veces con la punta de la pipeta.
- Tomar otros 200 µl con la pipeta y transferirlos al 3º tubo (dilución 10⁻³).

B) Líquidos orgánicos

- Tomar 200 µl del sedimento con la pipeta y transferirlos al 1º tubo (dilución 10⁻¹). Mezclar con la punta de la pipeta y realizar diluciones seriadas como en A).

C) Tejidos

- Introducir una de las piezas en un tubo con 1,8 ml de medio. Agitar en vortex y realizar diluciones seriadas como en A).
- Es importante realizar diluciones seriadas en el caldo, al menos hasta la dilución 10⁻³, para evitar interferencias en el crecimiento por antibióticos, anticuerpos y otros inhibidores presentes en la muestra.

7.2. INOCULACIÓN EN PLACAS DE AGAR SP-4

A) Torundas. Rotar la torunda sobre la superficie del agar o, en su defecto, inocular 50 µl del tubo de la primera dilución.

B) Líquidos orgánicos. Inocular en la placa 50 µl del sedimento o del medio de transporte. Efectuar con la placa tapada suaves movimientos de rotación para distribuir por su superficie el volumen inoculado.

C) Tejidos. Tomar con una aguja estéril una pieza del tejido y colocarla sobre el agar. Con la ayuda de la aguja, arrastrar la superficie fresca del corte de la pieza sobre toda la circunferencia de la placa.

7.3. INCUBACIÓN

Los caldos se incuban a 35-37°C en aerobiosis durante 6 semanas.

Las placas se incuban en la jarra con un sobre generador de CO₂ por el mismo periodo de tiempo.

7.4. LECTURA Y SUBCULTIVOS

Los caldos se examinarán cada 5 días para detectar cambio de color en el medio (del rojo original, al naranja y al amarillo).

Las placas se examinarán con microscopio estereoscópico (50X) y transiluminación para detectar la presencia de las típicas colonias de *M. pneumoniae*.

Ante cualquier cambio de color del medio subcultivar:

- 200 µl a otro tubo con medio fresco.
- 50 µl a una placa de agar

- 50 µl a una placa de agar Columbia sangre, solo en el caso de que el tubo cambiado de color presente turbidez, lo que indicaría contaminación por otras bacterias.

7.5. CONFIRMACIÓN DE ESPECIE

La confirmación de la especie se basa en la capacidad de *M. pneumoniae* para reducir el iodo-nitro-trifenil-tetrazolio (INT), que es incoloro, a rojo formazán. La prueba, se realiza inundando las colonias con 2 ml de una solución al 0,21% de INT e incubando la placa a 37°C durante 20-60 minutos, al cabo de los cuales las colonias aparecerán teñidas de color rojo granate.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Un organismo que metaboliza la glucosa del caldo SP-4, produce colonias en forma de grosella en el agar específico entre los 5-15 días de incubación, que posteriormente se tiñen con INT en rojo granate, corresponde en su identificación a *M. pneumoniae*.

Se informará: "se aísla *M. pneumoniae*", sin necesidad de indicar el título de crecimiento, ni realizar pruebas de sensibilidad a los antibióticos.

El aislamiento de *M. pneumoniae* del tracto respiratorio es clínicamente significativo en la mayoría de los casos, pero deberá relacionarse con la enfermedad clínica y ser, además, corroborado por las pruebas serológicas, ya que existen portadores asintomáticos.

El aislamiento de *M. pneumoniae* de cualquier líquido orgánico o tejido estéril, es siempre significativo.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del Laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista Responsable del Laboratorio de Microbiología que los emite.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- La baja sensibilidad del cultivo (inferior al 50%).
- El largo período de tiempo necesario para el crecimiento del microorganismo.
- La necesidad de cierto grado de experiencia para el reconocimiento de las colonias al microscopio, ya que deben diferenciarse de gotas de lípidos y pseudocolonias, producto de la precipitación de los ácidos grasos del medio.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Procesamiento microbiológico de las muestras respiratorias y de otras localizaciones para cultivo de <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	PNT-M-02	
		Edición N° 01	Página 4 de 4

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Waites KB, Balish MF, Precott Atkinson T. New insights into the pathogenesis and detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Future Microbiol* 2008;3:635-648.
2. Waites KB, Bébéar CM, Robertson JA, Talkington DF, Kenny GE. Laboratory diagnosis of micoplasmatal infections. *Cumitech* 34, Washington DC; ASM Press 2001.
3. Waites KB, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2004;17:697-728.

PNT-M-03
PROCESAMIENTO MICROBIOLÓGICO DE LAS MUESTRAS GENITOURINARIAS Y
DE OTRAS PROCEDENCIAS PARA CULTIVO DE *Ureaplasma* spp. y *Mycoplasma*
hominis

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		<i>Edición inicial</i>

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo del procedimiento es describir el cultivo, aislamiento e identificación de *Ureaplasma* spp. y *Mycoplasma hominis* en diferentes muestras clínicas, mediante inoculación en caldo urea arginina LYO 2 y placas de agar A7 (bioMérieux).

2. FUNDAMENTO

Los micoplasmas son microorganismos exigentes que carecen de membrana celular y requieren colesterol para su crecimiento, por lo que requieren medios especiales para su aislamiento.

En el hombre, *M. hominis* y *Ureaplasma* spp. colonizan normalmente la mucosa uretral y el surco balano prepuccial. En la mujer, *M. hominis* y *Ureaplasma* spp. colonizan con mayor frecuencia la vagina que el endocervix, o la uretra.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de Microbiología (PNT-RTP-01). Procedimiento SEIMC nº 1 a. SEIMC 2003. Disponible en:

<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

- Diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual y otras infecciones genitales. Procedimiento SEIMC nº 24. SEIMC 2007. Disponible en:

<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

- Isenberg HD (ed). Section 8: Virus, Rickettsiae, Chlamydiae and Mycoplasmas. En: Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington DC; ASM 2005.

- Ficha técnica Agar A7 Mycoplasma (MYCO) REF 43 003 bioMérieux®.

- Ficha técnica Urée-Arginine LYO 2 REF 42 508 bioMérieux®.

Las muestras reseñadas en la ficha técnica, son exudado uretral y cérvico-vaginal.

4. MUESTRAS

4.1. TIPOS DE MUESTRAS.

Genitourinarias: en el hombre, las muestras adecuadas son: la torunda uretral para el diagnóstico de la uretritis crónica y la torunda uretral, exudado prostático y/o semen para el diagnóstico de la prostatitis crónica.

En la mujer, las muestras adecuadas para el diagnóstico de endometritis y enfermedad inflamatoria pélvica deben obtenerse mediante procedimientos invasivos (laparoscopia) o durante la cirugía, ya que toda muestra recogida a través de la vagina quedará contaminada por los micoplasmas que habitualmente la colonizan. Lo mismo ocurre con la orina para el diagnóstico de la pielonefritis, debiéndose obtener muestra de orina por punción suprapúbica.

Cuando se utilizan torundas, se debe presionar vigorosamente a fin de obtener abundantes células, ya que estos microorganismos se asocian a las células.

Otras muestras: líquido sinovial, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo, semen, exudado de herida, aspirado traqueal y otras secreciones dependiendo del marco clínico. En los neonatos, son aceptables torundas de nasofaringe. También pueden utilizarse muestras de biopsia o autopsia de placenta, endometrio, cálculos urinarios, etc. El uso de muestras de orina, puede ser más adecuado para detección de *M. genitalium* mediante PCR.

Debe evitarse la contaminación de la muestra con antisépticos y lubricantes de uso frecuente en ginecología.

Sangre: para la detección de micoplasmas la sangre se recoge sin anticoagulantes, en medio líquido de crecimiento de micoplasmas, en una proporción 1:10, utilizando la mayor cantidad de sangre posible, unos 10 ml en adultos. El polianetolsulfonato utilizado en hemocultivos comerciales habituales inhibe su crecimiento. No se recomiendan los medios comerciales habituales de hemocultivo con o sin lectura automatizada, aunque *M. hominis* puede sobrevivir en ellos varios días, y recuperarse mediante subcultivo.

Muestras de tejido: se introducen en recipiente estéril y se puede añadir medio de transporte para evitar la desecación.

Torundas: son adecuadas las torundas de alginato de calcio, dacrón o poliéster; con vástago de aluminio o plástico. No lo son, las de algodón y vástago de madera.

4.2. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD.

Los micoplasmas son muy sensibles a la desecación, y al calor, por lo que las muestras deben ser inoculadas inmediatamente en un medio de transporte y/o cultivo adecuado. Las torundas con medio de Stuart, son adecuadas. **El vial R1 del equipo Urea-Arginina** (bioMérieux) también puede ser utilizado como medio de transporte.

Las muestras líquidas no necesitan medio de transporte, si se inoculan dentro de la hora de realizarse la toma.

Deben ser transportadas lo antes posible al laboratorio, y pueden mantenerse hasta 24 horas a 4°C antes de inocular en medio de crecimiento. Si el cultivo se retrasa por períodos más prolongados, se conservarán congeladas a -70°C. Antes del cultivo, descongelar rápidamente en un baño a 37°C. El almacenamiento a -20°C es nocivo, incluso para procesamiento mediante PCR.

En caso de retraso en la siembra, las muestras de **orina** deben ser centrifugadas y el sedimento diluido 1:1 en medio de transporte antes de congelar.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Procesamiento microbiológico de las muestras genitourinarias y de otras procedencias para cultivo de <i>Ureaplasma</i> spp. y <i>Mycoplasma hominis</i>	PNT-M-03	
		Edición N° 01	Página 3 de 5

5. MEDIOS DE CULTIVO

A) Caldo Urea-Arginina (U/A) LYO bioMérieux®
Permite el cultivo selectivo de *M. hominis* y *Ureaplasma* spp. sin diferenciar especies (*parvum* y *urealyticum*).

R1: Cada frasco contiene 3,1 ml de un caldo con elementos nutritivos estables, necesarios para preparar la muestra. Asegura la selectividad con respecto a las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y permite reconstituir el R2. Puede ser utilizado como **medio de transporte**.

R2: Liofilizado que contiene extracto de levadura, suero de caballo, urea, arginina, Poly ViteX y antibióticos. Además de los nutrientes, incluye rojo de fenol, como indicador de crecimiento.

El medio reconstituido tiene pH 6,3.

B) Agar Mycoplasma A7 bioMérieux®. El agar diferencial A7 permite el crecimiento de *M. hominis* y *Ureaplasma* spp. y pueden diferenciarse uno de otro por la morfología de las colonias. La identificación definitiva de *Ureaplasma* spp. y *M. hominis* puede ser realizada sin necesidad de otras pruebas o reactivos adicionales.

6. APARATOS Y MATERIAL

Pipetas desechables

Pipeta calibrada

Puntas de pipeta

Agitador tipo vórtex

Escalpelo

Estufa de CO₂ de 35°-37°C

Microscopio invertido o de epiiluminación, con objetivo 10x.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD

Los micoplasmas son microorganismos patógenos categoría 2. El trabajo con estos microorganismos puede realizarse en un banco de trabajo del laboratorio y/o en cabina de seguridad clase 2.

7.2. INOCULACIÓN DEL CALDO UREA-ARGININA (R1)

Torundas (vaginal, uretral, frotis faríngeo):

- Introducir la torunda en el medio de transporte R1, y agitar en el vórtex; exprimirla en las paredes del vial y desecharla.
- Utilizando pipeta desechable, dispensar el líquido en el vial R2, homogenizar con la misma pipeta y agitar en vórtex hasta la disolución del liofilizado.

Aspirado traqueal:

Se inocula en medio de transporte R1. Se mezcla con el liofilizado R2 y se homogeneiza agitando en vórtex.

Orina, líquido amniótico:

Centrifugar 10 ml de muestra a 600xg, 15 minutos. Descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 3 ml de medio de transporte R1. Añadir al liofilizado R2, como se explica arriba.

Líquido cefalorraquídeo:

Inocular directamente 300 µl en el frasco de 3 ml de R1. Mezclar con el vial R2 de liofilizado de caldo urea-arginina.

Semen:

Se inocula directamente y después de realizar una dilución de la muestra 1:10 en solución fisiológica.

Sangre:

La muestra de sangre se recoge en el medio de transporte (dilución 1:10). Con el fin de evitar la inhibición de crecimiento por sustancias presentes en la sangre, se realizan diluciones seriadas, hasta 10⁻³ en caldo urea-arginina. Se inoculará una placa de agar A7 de cada dilución.

Tejidos:

Se pueden cultivar muestras de lavado y biopsia de endometrio, tejido placentario y amniótico, tejidos de feto y aborto, biopsias de trompas de Falopio, útero, biopsias de heridas, etc. Cortar la muestra con bisturí, en una placa de Petri estéril, y no homogeneizarla. Una vez inoculada en el medio de crecimiento es útil realizar diluciones seriadas 1:10, hasta 10⁻³ para evitar la inhibición que puede ocurrir por la presencia de antibióticos, anticuerpos, y otros inhibidores que pueden estar presentes en las muestras clínicas.

Todas las muestras se inoculan en agar A7 para realizar la cuantificación de las colonias. En caso de realizar diluciones, se inocula una placa de agar de cada dilución.

7.3. INOCULACIÓN DEL AGAR A7

- Dejar atemperar las placas hasta que alcancen la temperatura ambiente, en caso necesario secar la superficie en estufa a 37°C.
- Depositar 3 gotas de 10 µl de caldo urea-arginina previamente sembrado o de la muestra líquida, sin extender. Las gotas no deben ser confluentes.
- Dejar secar las placas 5 minutos a temperatura ambiente.
- Los cultivos se examinan tras 24-48 horas de incubación.

7.4. CONDICIONES DE INCUBACIÓN Y SUBCULTIVOS

A) Incubación:

Las placas de agar A7 se incuban en atmósfera microaerófila (10% de CO₂) a 33°-37°C.

Incubar los caldos a 35-37°C en atmósfera aerófila.

B) Subcultivo:

El subcultivo en agar, debe ser realizado rápidamente una vez que se produce el cambio de color, para evitar la pérdida de viabilidad. Este problema se evita en parte con el uso de diluciones seriadas. Los subcultivos aumentan las posibilidades de aislamiento, ya que algunas cepas no crecen en el agar inoculado inicialmente.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Procesamiento microbiológico de las muestras genitourinarias y de otras procedencias para cultivo de <i>Ureaplasma</i> spp. y <i>Mycoplasma hominis</i>	PNT-M-03	
		Edición N° 01	Página 4 de 5

Dispensar el caldo en una placa de agar A7, sin estriar, como en la siembra inicial, o simplemente 3 gotas en la superficie del agar, extendiendo sin estriar.

Para realizar un subcultivo a partir del medio sólido se corta un trozo del agar con un escalpelo y se introduce en un caldo.

C) Desarrollo de colonias:

Lectura del agar: las placas se observan tras 24-48 h de incubación, con objetivo 10x. La lectura se puede hacer con microscopio invertido orientando la superficie del agar hacia arriba, o con microscopio de epiiluminación orientando la superficie hacia abajo. Las colonias de *Ureaplasma* spp. aparecen en uno a tres días y tienen entre 15-50 µm de diámetro, son de color marrón oscuro por la precipitación del sulfato de manganeso en la colonia, con aspecto característico de "erizo de mar".

Las colonias de *Mycoplasma hominis*, aparecen en 1-3 días, con un tamaño 100 a 300 µm y forma de huevo frito.

Recuento indicativo: observar un mínimo de tres campos con objetivo 10x de cada gota depositada. El título de la muestra se estima a partir del número de colonias presentes por campo, teniendo en cuenta si se ha realizado una dilución y el volumen inicial de la muestra.

7.5. CONTROL DE CALIDAD

El control de calidad debe incluir el cultivo de la cepa tipo *Ureaplasma urealyticum* ATCC® 27813 y *Mycoplasma hominis* ATCC® 23114. Puede utilizarse una cepa de aislados clínicos con bajo número de pases, de cada uno de los microorganismos que se quiere aislar.

También es importante la comprobación de la posibilidad de inhibición del crecimiento por otros microorganismos probablemente presentes en la muestra, que pueden inhibir el crecimiento de los micoplasmas.

Precultivo: se realiza un cultivo de la cepa en caldo Ura-Arginina LYO 2, preparando diluciones sucesivas, 1:10. Se elige la mayor dilución que muestra inicio de cambio de color.

Inoculación: el caldo elegido se diluye 1:100 y se inocula en Agar A7 de la manera habitual.

Las colonias se observan a las 48h, con su aspecto característico (ver ficha técnica).

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Descartar los caldos que no presentan cambios de color en 7 días. En la práctica, en las muestras genitourinarias habituales, los aislados crecen en las primeras 48-72 horas de incubación.

Lectura del caldo: observar los cambios de color en los viales de caldo a partir de las 24 horas de incubación.

	Negativo	Positivo <i>Ureaplasma</i> spp. y/o <i>Mycoplasma hominis</i>
Coloración del caldo	Amarillo	Naranja a rojo Uu: transparente Mh: ligeramente opalescente

Colonias por campo (objetivo 10x)	UFC en el inóculo*
< 1	10 ³ UFC
1-5	10 ⁴ UFC
5-15	10 ⁵ UFC
> 15	10 ⁶ UFC
Cultivo caldo (+) / cultivo inicial agar A7 (-)	< 10 ² UFC

*El volumen del inóculo corresponde a 3 ml de caldo urea-arginina en muestras en torunda.

9. RESPONSABILIDADES

El procedimiento será realizado por personal técnico cualificado.

La supervisión y validación de los resultados debe llevarla a cabo el facultativo especialista.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

En los casos en los que exista contaminación con otro microorganismo, puede aparecer turbidez y ausencia de viraje del color aunque exista crecimiento de micoplasmas. En estos casos, es posible observar las colonias en la placa de agar A7 de la siembra inicial al mismo tiempo que las colonias contaminantes, o al realizar un subcultivo aunque solamente se observe turbidez, sin cambio de color. En el subcultivo, cuando el inóculo es muy elevado, la morfología de las colonias es menos definida.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Debe evitarse la contaminación de la muestra con antisépticos o lubricantes de uso frecuente en ginecología. La presencia de inhibidores en la muestra, sobre todo en muestras de sangre y tejidos, puede requerir la realización de diluciones seriadas, para evitar la inhibición de crecimiento de los micoplasmas.

El procesamiento de muestras de sangre, exige un volumen importante de muestra y de medio de cultivo.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Procesamiento microbiológico de las muestras genitourinarias y de otras procedencias para cultivo de <i>Ureaplasma</i> spp. y <i>Mycoplasma hominis</i>	PNT-M-03	
		Edición N° 01	Página 5 de 5

12. BIBLIOGRAFIA

1. Jensen, JS, Bjornelius E, Don B, Lidbrink P. Comparison of first void urine and urogenital swab specimens for detection of *Mycoplasma genitalium* and *Chlamydia trachomatis* by polymerase chain reaction in patients attending a sexually transmitted disease clinic. Sex Transm Dis 2004; 31:499-507.
2. Waites KB, Cannup KC. Evaluation of BacT/ALERT system for detection of *Mycoplasma hominis* in simulated blood Cultures. J Clin Microbiol 2001; 39:4328-4331.
3. Waites KB, Taylor-Robinson D. Mycoplasmas and Ureaplasmas, pp: 1004-1020. In: Murray PR. (ed) Manual of Clinical Microbiology, 9ª ed. ASM 2007.
4. Washington CW, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Scheckenberger PC, Woods GL, eds. Mycoplasmas and Ureaplasmas. En: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 2006.

PNT-M-04
DETECCIÓN DE ADN DE *Mycoplasma pneumoniae* MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de ADN de <i>Mycoplasma pneumoniae</i> mediante PCR en tiempo real	PNT-M-04	
		Edición N° 01	Página 2 de 3

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología básica para la determinación de ADN de *Mycoplasma pneumoniae* en muestras respiratorias y, de forma alternativa, en otras muestras mediante amplificación de ácidos nucleicos por PCR en tiempo real.

2. FUNDAMENTO

La infección por *Mycoplasma pneumoniae* comporta su replicación en el foco, de forma que se puede detectar su ADN. Para ello se realizará una PCR en tiempo real con una sonda de tipo TaqMan. Los *primers* y sonda se han escogido para hibridar con una región altamente conservada del gen que codifica la adhesina P1, y que se encuentra presente en una única copia para simplificar la cuantificación.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento de recogida y procesamiento de muestras. SEIMC 2003. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>
- Normas de bioseguridad
- Gestión de residuos

4. MUESTRAS

Las muestras adecuadas son las procedentes de vías respiratorias: esputos, exudados nasofaríngeos tomados con torundas, lavados nasofaríngeos, lavados broncoalveolares o líquidos pleurales. También pueden utilizarse otras muestras biológicas como sangre con EDTA o líquido cefalorraquídeo. Las condiciones para la recogida y el transporte deben contemplar:

- Respetar las normas descritas en el procedimiento de recogida y procesamiento de las muestras en el laboratorio de Microbiología.
- El volumen mínimo aceptable es de 200 microlitros.
- Identificar correctamente el tubo (código empleado) y los tubos que se deriven de los procesos subsiguientes: extracción de ácidos nucleicos y PCR.
- Si no se puede procesar inmediatamente, se recomienda no prolongar la conservación a 4°C más de 6 días. El ADN extraído se puede guardar a -70°C durante periodos prolongados.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- **Master mix:** Quantitect multiplex PCR no Rox, de Qiagen
- **Control interno:** TaqMan Exogenous Internal Positive Control Reagent (IPC, Applied Biosystems). Este equipo contiene:
 - ADN del control interno: Exo IPC DNA
 - *Primers* y sonda marcada con VIC, específicos para el control interno: Exo Mix IPC
- **Primers y sonda marcada** con FAM y BHQ, específicos para *M. pneumoniae*.

Primer forward	CCA ACC AAA CAA CAA CgT TCA
Primer reverse	ACC TTg ACT ggA ggC CgT TA
Sonda	FAM-TCA ACT CgA ATA ACg gTg ACT TCT TAC CAC Tg-BHQ

- Curva de calibración: se prepararán diluciones de una cepa patrón siguiendo la escala: 10¹ a 10⁶.

6. APARATOS Y MATERIAL

- Microcentrífuga para tubos de fondo cónico y rotor angular, con velocidad de rotación mínima de 13.000 g
- Agitador orbital tipo vórtex.
- Termociclador: la técnica está validada con los sistemas ABI Prism 7700 Sequence Detection System de Applied Biosystems, y Smartcycler de Cepheid. La utilización de otros termocicladores debe validarse previamente.
- Cabina de seguridad
- Pipetas de volumen variable
- Tubo de plástico de fondo cónico tipo Eppendorf de 1,5 ml
- Tubo de plástico del tamaño adecuado para el termociclador
- Puntas con filtro de diferentes calibres

7. PROCEDIMIENTO

- El procesamiento de las muestras se hará en campana de bioseguridad
- Las muestras tomadas en torunda se homogeneizarán en 1-2 ml de una solución tamponada como PBS. Resuspender presionando contra las paredes del tubo.
- Las muestras líquidas muy viscosas se diluirán con 1-2 ml de solución tamponada como PBS. Agitar con vórtex energicamente
- Las muestras de sangre se pueden procesar completas, o bien separando el plasma
- La extracción de ácidos nucleicos se realizará según se detalla en el procedimiento habitual de trabajo del laboratorio correspondiente

7.1. AMPLIFICACIÓN

- La reacción se hace en un volumen final de 50 microlitros, con 25 µl de Quantitect multiplex PCR no Rox master mix, 5 µl de Exo Mix IPC, 1 µl de Exo IPC DNA, 0,04 µM de cada *primer*, 0,05 µM de la sonda, y 10 µl de ADN extraído de la muestra
- El protocolo de amplificación es de 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, y 50 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.
- **Controles:**
 - Cada vez que se realice la técnica, se debe incluir un control positivo conocido y un control negativo.
 - La curva de calibración puede procesarse y guardar los resultados en la memoria del sistema informático del termociclador. De esta forma se puede recuperar siempre que se desee y no es necesario analizarla cada vez que se realice la técnica. Deberá calibrarse

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de ADN de <i>Mycoplasma pneumoniae</i> mediante PCR en tiempo real	PNT-M-04	
		Edición N° 01	Página 3 de 3

nuevamente como mínimo cada vez que se cambie el lote de alguno de los reactivos

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados pueden expresarse en términos cualitativos de positivo o negativo, o bien cuantificados en copias por mililitro de muestra.

La amplificación para *M. pneumoniae* se lee en el canal FAM, y la del control interno en el canal VIC.

Si no amplifica ni la diana ni el control interno, la reacción no es válida y se debe repetir el procedimiento diluyendo el ADN extraído o bien con otra extracción.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico.

La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista Responsable del Laboratorio de Microbiología que los emite.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Las limitaciones que se presentan con estas pruebas son similares a los de otras pruebas de PCR en tiempo real.

La sensibilidad de la técnica depende en gran medida de una correcta toma de muestra y de una buena extracción de ácidos nucleicos

Es posible obtener resultados positivos a partir de infecciones de varios días de evolución, por lo que un resultado positivo indica presencia de ADN de *M. pneumoniae*, pero puede corresponder a infección pasada.

Si se realiza la técnica a partir de muestras procedentes de vías respiratorias altas, la detección de ADN de *M. pneumoniae* puede darse cuando este microorganismo esté presente formando parte de la microbiota comensal, aunque usualmente la cuantificación será de baja cantidad.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Welti M, Jatón K, Altwegg M, Sahli R, Wenger A, Bille J. Development of a multiplex real-time quantitative PCR assay to detect *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* and *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract secretions. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 45:85-95.

PNT-M-05
TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS DE
Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma spp.

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnicas para la determinación de la sensibilidad a los antibióticos de <i>Mycoplasma hominis</i> y <i>Ureaplasma spp.</i>	PNT-M-05	
		Edición N° 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Describir el procesamiento, lectura e interpretación de las pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antimicrobianos de los micoplasmas, en particular de los micoplasmas urogenitales, *Ureaplasma spp.* y *Mycoplasma hominis*.

2. FUNDAMENTO

Los micoplasmas, debido a su carencia de pared celular son resistentes a los antibióticos β -lactámicos. También tienen resistencia natural a los glicopéptidos, sulfonamidas, trimetoprim-sulfametoxazol, polimixinas, ácido nalidíxico y rifampicina.

Los antibiogramas potencialmente activos incluyen tetraciclinas, macrólidos, lincosamidas, estreptograminas, fluoroquinolonas, aminoglucósidos y cloranfenicol.

La sensibilidad a los macrólidos y lincosamidas varía de acuerdo con la especie. Así, *M. hominis* que es sensible a las lincosamidas presenta resistencia intrínseca a los macrólidos, mientras que los *Ureaplasmas* y *M. pneumoniae* presentan resistencia natural a las lincosamidas y son sensibles (en general) a los macrólidos.

M. pneumoniae era, hasta recientemente, invariablemente sensible a tetraciclinas, macrólidos y a las nuevas fluoroquinolonas, por lo que no estaba indicada la realización rutinaria de pruebas de sensibilidad. La aparición en 2001 de cepas resistentes a macrólidos en Japón, podría hacer necesaria la determinación de su sensibilidad.

Se han descrito tanto en *Ureaplasma spp.* como en *M. hominis* resistencia a las tetraciclinas mediada por el trasposón *tet M* y la tasa varía geográficamente, con la población y con la exposición previa al antimicrobiano.

Las nuevas fluoroquinolonas tienen, en general, una actividad *in vitro* superior a la de las anteriores (ciprofloxacino) y pueden ser micoplasmicidas. No obstante, se han descrito aislados clínicos de *M. hominis* con resistencia a las fluoroquinolonas asociada con alteraciones en la ADN girasa y en la topoisomerasa IV.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Normas de bioseguridad
- Gestión de residuos

4. MUESTRAS

Especies a estudiar

4.1. UREAPLASMA SPP. Y M. HOMINIS

Aislados a partir de las muestras clínicas inoculadas en los respectivos medios, caldo 10-C y caldo Urea-Arginina. Ver PNT-M-03 de este procedimiento.

4.2. CULTIVOS MIXTOS

Con frecuencia, en las muestras del tracto urogenital, se obtienen cultivos mixtos de ambas cepas en el caldo, visualizados en la placa de agar A7. En estos casos puede ser necesario el aislamiento y

separación de las especies antes de realizar la prueba de sensibilidad.

4.3. OBTENCIÓN DE UN CULTIVO PURO DE UREAPLASMA SPP Y M. HOMINIS A PARTIR DE UN CULTIVO MIXTO

Para eliminar *M. hominis*, realizar un subcultivo del caldo (100 μ l) a otro tubo de medio 10-C (0,9 ml) o a un vial de medio Urea-Arginina e introducir un disco de clindamicina. Incubar 24 a 48 horas. Cuando se produzca crecimiento (cambio de color) subcultivar a una placa de agar A7 y congelar el tubo a -20°C. Incubar la placa con CO₂ durante 2 días y comprobar al microscopio estereoscópico el crecimiento único de colonias de *Ureaplasma* y la ausencia de colonias de *M. hominis*. Descongelar el tubo del subcultivo y realizar las pruebas de sensibilidad.

Para eliminar *Ureaplasma spp.* de un cultivo mixto, proceder de igual manera subcultivando a un tubo con caldo y un disco de eritromicina.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Caldo 10-C (caldo-urea) para cultivo de *Ureaplasma spp.*
- Caldo de arginina para cultivo de *M. hominis*, o
- Caldo urea-arginina LYO bioMérieux
- Agar A7

La composición de los medios se describe en el PNT-M-03 de este procedimiento.

- Galerías *Mycoplasma IST 2* (bioMérieux).

Consisten en unas galerías con micropocillos que contienen antimicrobianos desecados, generalmente en 2 concentraciones que corresponden al punto de corte propuesto para clasificar a las cepas como sensibles, intermedias o resistentes. Incluyen los antibióticos siguientes: doxiciclina (4 y 8 mg/L), josamicina (2 y 8 mg/L), ofloxacino (1 y 4 mg/L), eritromicina (1 y 4 mg/L), tetraciclina (1 y 8 mg/L), ciprofloxacino (1 y 2 mg/L), azitromicina (0,12 y 4 mg/L), claritromicina (1 y 4 mg/L) y pristinamicina (2 mg/L).

El equipo (que debe conservarse entre 2 y 8°C) incluye:

- Un frasco R1, con 3,1 ml de caldo nutritivo selectivo (3 antibióticos para eliminar la microbiota grampositiva y gramnegativa y un antifúngico) con un indicador de pH (rojo fenol).
- Un frasco R2, con 1 ml de caldo urea-arginina en forma liofilizada.
- En el momento de realizar la prueba, reconstituir el frasco R2 con 3 ml del frasco R1. La composición corresponderá a un medio de cultivo completo y específico para crecimiento de *Ureaplasma spp.* y *M. hominis* que permite, en caso de crecimiento del microorganismo, visualizar el cambio de color correspondiente al aumento de pH.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnicas para la determinación de la sensibilidad a los antibióticos de <i>Mycoplasma hominis</i> y <i>Ureaplasma spp.</i>	PNT-M-05	
		Edición N° 01	Página 3 de 4

- **Tiras de E-test** de diferentes antibióticos. Tiras disponibles comercialmente, que pueden mantenerse congeladas durante 3 a 5 años.

6. APARATOS Y MATERIAL

- Microscopio estereoscópico WILD M5.
- Estufa de cultivo $36 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Jarras de incubación
- Generadores de CO_2
- Micropipeta de 50 a 1000 μl .
- Puntas estériles
- Agitador tipo vórtex

7. PROCEDIMIENTO

A) Galerías *Mycoplasma* IST 2 (bioMérieux)

Atemperar los reactivos a temperatura ambiente.

- Inocular el frasco R1 con 200 μl del caldo crecido con la cepa de *Ureaplasma spp.* o *M. hominis* a testar.
- Agitar en vórtex
- Transferir 3 ml del frasco R1 al frasco R2*.
- Agitar en vórtex hasta la disolución completa del liofilizado.
- Inocular el caldo R2 en las cúpulas de la galería a razón de 55 μl por cúpula.
- Añadir 2 gotas de aceite de parafina en cada cúpula.
- Colocar la tapa sobre la galería
- Incubar la galería y el resto del caldo que contiene el frasco R2 durante 24 a 48 horas a 36°C .
- * En caso necesario, este frasco de caldo completo inoculado con la cepa se puede conservar 48 horas a $2-8^\circ\text{C}$ antes de inocular la galería.

B) Prueba con tiras de E-test o de gradiente de difusión en agar.

Esta técnica, además de sencilla presenta la ventaja de que el punto inhibición no se afecta con el tiempo de incubación, ni se afecta por inóculos grandes. Está indicada para determinar la sensibilidad de *Ureaplasma spp.* y *M. hominis* a otros antibióticos no incluidos en las galerías y que se utilizan para el tratamiento de infecciones en localizaciones o pacientes especiales (neonatos, embarazadas, etc).

- Se requiere una suspensión del microorganismo en caldo de al menos 10^5 UFC/ml.
- Inocular 0,5 ml de la suspensión sobre una placa de agar A7.
- Rotar suavemente la placa para que el líquido se distribuya homogéneamente sobre la superficie.
- Dejar secar la placa (15 minutos).
- Colocar la tira E-test sobre la superficie de la placa.
- Incubar la placa (5% CO_2) durante el tiempo requerido por cada especie.
- Observar la placa bajo el microscopio estereoscópico.

7.1 LECTURA

A) Galerías *Mycoplasma* IST 2 (bioMérieux)

- Leer la galería a las 24 horas. Considerar crecidos (resistentes) los pocillos con cambio de color

(púrpura) e inhibidos (sensibles) los pocillos sin cambio de color (amarillos). Anotar los resultados.

- Incubar 24 horas adicionalmente.
- Volver a leer la galería. Corregir la lectura del día anterior, si fuera necesario, y anotar los resultados finales.
- Se considera que la cepa es sensible si no hay crecimiento en ninguna de las dos concentraciones del antibiótico.
- Se considera que la cepa es resistente si hay crecimiento en las dos concentraciones del antibiótico.
- Se considera que la cepa es intermedia si hay crecimiento en el pocillo que contiene la concentración más baja del antibiótico y no hay crecimiento en el pocillo que contiene la concentración más alta.

B) Prueba con tiras de E-test

- Realizar la lectura cuando se vean colonias en la periferia y se haga aparente la elipse alrededor de la tira de E-test.
- La CMI del antibiótico es el número de la tira E-test que corresponda con la intersección del crecimiento del micoplasma.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

A) Galerías *Mycoplasma* IST 2 (bioMérieux)

Los resultados de la sensibilidad de la cepa estudiada a cada uno de los antibióticos testados se expresarán como sensible, resistente o intermedia.

B) Prueba con tiras de E-test

Se expresará el valor de la CMI en $\mu\text{g/ml}$ leído en la tira. Asimismo, se indicará si la cepa es sensible, resistente o intermedia.

9. RESPONSABILIDADES

El procedimiento será realizado por personal técnico cualificado.

La supervisión y validación de los resultados será llevada a cabo por el facultativo especialista.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

A) Galerías *Mycoplasma* IST 2:

- No utilizar reactivos después de la fecha de caducidad, o si presentan alteraciones, turbidez, cúpulas deformes, etc.
- Comprobar siempre que el tubo R2 incubado presenta cambio de color, al igual que la cúpula testigo de crecimiento de la galería. Si esta última no estuviera crecida, el inóculo de la cepa sería demasiado bajo e invalidaría los resultados de las sensibilidades a los antibióticos.

B) Tiras de E-test:

- Con frecuencia, para obtener un título igual o mayor a 10^5 de *Ureaplasma spp.* puede ser necesario crecer un volumen de 10 ml de caldo, centrifugar 20 minutos a 10.000 rpm y suspender el sedimento en 1 ml de caldo.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnicas para la determinación de la sensibilidad a los antibióticos de <i>Mycoplasma hominis</i> y <i>Ureaplasma spp.</i>	PNT-M-05	
		Edición N° 01	Página 4 de 4

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- No dar como definitiva la lectura de la galería hasta las 48 horas de incubación.
- Si en la lectura de la galería, la cepa resulta sensible a la concentración más baja del antibiótico y resistente a la más alta el resultado no tiene sentido. En ese caso repetir la prueba.
- La determinación de la sensibilidad con tiras de E-test puede resultar con un elevado coste si se evalúan un gran número de antibióticos diferentes.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Dosa E, Nagy E, Falk W, Szoke I, Ballies U. Evaluation of the Etest for susceptibility testing of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*. J Antimicrob Chemother 1999; 43:575-578.
2. Waites KB, Bébéar CM, Robertson JA, Talkington DF, Kenny GE. Cumitech 34. Laboratory Diagnosis of Mycoplasmal Infections. American Society for Microbiology. ASM Press 2001. Washinton, DC.