

Dr. Jesús Reyna Figueroa.^{1*}
M. en C. Saúl Flores Medina.¹
M. en C. Iyari Morales Méndez.¹
QBP Selene García Romero.¹
Dr. Federico Javier Ortiz Ibarra.¹

¹ Departamento de Infectología e Inmunología Perinatal, Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes.

Identificación de *Ureaplasma urealyticum* en líquido cefalorraquídeo (LCR) de recién nacidos con sospecha de neuroinfección mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Fase de estandarización.

Resumen

Como parte del estudio que pretende conocer la eficacia de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico de infección por *Ureaplasma urealyticum* en el sistema nervioso central de pacientes recién nacidos, se reportan los resultados de la primera fase, en la cual se estandarizaron las condiciones de amplificación para la detección de *U. urealyticum*, mediante la reacción en cadena de la polimerasa a partir de muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) de recién nacidos con sospecha de neuroinfección. Un total de 50 muestras clínicas de LCR se inocularon con una cepa clínica de *U. urealyticum* (10^4 UFC). A partir de esta concentración se realizaron diluciones seriadas: 10^3 , 10^2 , 10^1 y 10^0 , de tal manera que a todas estas muestras se les extrajo el DNA, por medio de la técnica de fenol-cloroformo. Se emplearon condiciones ya establecidas y estandarizadas en el laboratorio, con las cuales se consiguió una detección de 100% en las diluciones 10^3 , 10^2 , 10^1 , incluyendo el inóculo inicial 10^4 . En la dilución 100 únicamente se identificó al microorganismo en 29 muestras. El cambio más significativo se realizó en la temperatura de alineación. Esto puede tener repercusión para un diagnóstico más confiable en la detección temprana de infección en recién nacidos con sospecha de infección.

Palabras clave: líquido cefalorraquídeo, neuroinfección, reacción en cadena de la polimerasa, recién nacidos, *Ureaplasma urealyticum*.

Abstract

We report the results of the first phase of a study directed to assess the efficacy of polymerase chain reaction (PCR) in the detection of *Ureaplasma urealyticum* in the cerebrospinal fluid in newborns. In this phase, we standardized the technique in CSF in newborns. We also describe specific conditions for the amplification of the bacterial genome. Fifty DNA extractions from clinical CSF samples were inoculated with *U. urealyticum* 10^4 CFU. We made four dilutions 10^3 , 10^2 , 10^1 y 10^0 . We analyzed this samples using phenol-chloroform method of PCR, and we probe some new conditions. The modifications made by us include dilutions of 10^3 , 10^2 , 10^1 , obtaining a 100% rate of detection of DNA. The most important change was in the aligning temperature. This may have implications for a more reliable diagnosis in the early detection of infection in newborns with suspected infection.

Key words: cerebrospinal fluid, neuroinfection, polymerase chain reaction, newborn, *Ureaplasma urealyticum*.

Introducción

Ureaplasma urealyticum es una bacteria que coloniza un gran porcentaje de mujeres en edad reproductiva con transmisión en el recién nacido hasta un 66%, y cuyo espectro clínico varía desde la enfermedad respiratoria hasta la sepsis y la meningitis.¹ A pesar de estas cifras elevadas, la búsqueda de *U. urealyticum* como causante de infección en recién nacidos se limita, en el mejor de los casos, a pacientes con dificultad respiratoria

*Correspondencia:

Dr. Jesús Reyna Figueroa

Dirección: Montes Urales 800, Col. Lomas Virreyes, Delegación Miguel Hidalgo, CP. 11000, México, D.F.

Teléfono: 01(55) 5520 9900 Ext. 334.

e-mail: jesusreynaf@prodigy.net.mx

o alteraciones gasométricas, debido a la dificultad que conlleva su aislamiento en cultivos microbiológicos.¹⁻³

En últimas fechas, las pruebas de biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR, por sus siglas en inglés), han sido los métodos que proporcionan en forma rápida la identificación de *U. urealyticum* en muestras clínicas de secreción pulmonar y orina, así como secreciones cervicales.⁴

Los reportes de casos de meningitis en los que *U. urealyticum* se ha aislado en muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) o tejido cerebral, son ocasionales y son resultado probablemente de una infección *in utero* o de la colonización del recién nacido, con su subsecuente diseminación. En adición, este tipo de infección se observa con más frecuencia si existen anomalías anatómicas, como espina bífida. Algunos autores mencionan que la infección por *U. urealyticum* debe ser considerada en casos de enfermedad neonatal del sistema nervioso central, aun cuando los estudios bacteriológicos de rutina y técnicas de cultivo sean negativos.⁵⁻¹¹

En el Instituto Nacional de Perinatología (INPer), un alto porcentaje de pacientes con sospecha de sepsis y/o compromiso neurológico son negativos a los cultivos microbiológicos de rutina,¹² por lo que creemos importante corroborar o descartar el papel que juega *U. urealyticum* en esta población. Para ello, en el presente trabajo se empleó la técnica de PCR, la cual presenta una mayor sensibilidad y especificidad, además de proporcionar resultados rápidos y confiables. Sin embargo, es importante estandarizar la técnica en muestras clínicas de LCR, en la que se ha reportado la presencia de inhibidores que impiden la amplificación de ácidos nucleicos en forma adecuada, por lo tanto, la propuesta fue realizar cambios en las condiciones del amplificado a partir de las metodologías ya reportadas para diferentes muestras biológicas diferentes al LCR. De esta manera, es posible contar con una técnica altamente sensible que dé solución inmediata a la identificación de *U. urealyticum*, lo que evita los problemas que implica la identificación mediante cultivos microbiológicos. En este trabajo se reporta la fase de estandarización de la técnica de PCR en LCR para la identificación de *U. urealyticum* en pacientes con datos de neuroinfección.

Métodos

Cepa

Se aisló una cepa de *U. urealyticum* de una muestra clínica, con la finalidad de contar con un control posi-

tivo. La cepa se ajustó a 10^4 UFC/mL y se almacenó a -70°C hasta su procesamiento. La cepa ajustada a 10^4 UFC/mL se inoculó en todas las muestras de LCR (con resultados negativos al análisis microbiológico de rutina), a las cuales se les realizaron diluciones seriadas: 10^3 , 10^2 , 10^1 y 10^0 . A todas las muestras se les extrajo el DNA y se llevó a cabo la PCR para el diagnóstico de *U. urealyticum*.

Extracción de DNA total

Quinientos microlitros de LCR fueron colocados en tubos tipo Eppendorf y centrifugados a 10,000 rpm durante diez minutos, posteriormente, se desechó el sobrenadante y al botón celular se le adicionaron 300 μL de solución de lisis (proteínasa K 200 mg/ml); los tubos se agitaron en vortex durante 15 segundos, y se incubaron a 56°C durante una hora (con agitación periódica). Al término de la incubación se agregaron 300 μL de una mezcla de fenol-cloroformo (1:1) y enseguida se centrifugaron a 3,000 rpm durante diez minutos a temperatura ambiente. La fase acuosa se transfirió a tubos nuevos y se le agregaron 600 μL de cloroformo; los tubos se agitaron en vortex durante cinco minutos, y se centrifugaron nuevamente a 3000 rpm por diez minutos; el sobrenadante se transfirió a tubos nuevos y se añadieron 30 μL de una solución de NaCl 1 M y 1 mL de etanol absoluto a 4°C , los tubos se agitaron por inversión suavemente y se centrifugaron a 12,500 rpm durante diez minutos a 4°C . Pasado este tiempo, se eliminó el sobrenadante y el botón resultante (DNA) se resuspendió en una solución de Tris-EDTA. Enseguida se verificó la integridad del DNA, corriendo las muestras en un gel de agarosa a 0.8%, a 75 V durante 40 minutos; al término del corrimiento, el gel se reveló con una solución de bromuro de etidio a 0.1%, para ser evaluado en un analizador de imágenes (Multimage, Light Cabinet, Alpha Innotech Corporation).

Detección de *Ureaplasma urealyticum* mediante la técnica PCR

Se realizaron dos técnicas de PCR. La primera fue con las condiciones de amplificación, según Blanchard y cols.¹³ para la identificación del microorganismo en muestras de recién nacidos con dificultad respiratoria; la segunda se llevó a cabo con las condiciones adaptadas en nuestro laboratorio, las cuales se describen a continuación: la reacción se realizó en un volumen final de 35 μL ; la mezcla contenía agua desionizada, solución de buffer (1X), 10 mM de dNTP's, 0.6 pMol/ μL de cada iniciador, 2.5 mM de MgCl_2 , 1.5 U/ μL de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen, Carlsbad CA) y DNA blanco (100 ng/ μL). La reacción se inició con una

desnaturalización previa del DNA a 94° C durante tres minutos. Posteriormente, se realizaron 35 ciclos de amplificación y una extensión final a 72° C por cinco minutos. Cada ciclo consistió en un paso de desnaturalización a 94° C por 20 segundos, alineación de los iniciadores a 60° C durante un minuto y un paso de extensión a 72° C por un minuto. Para la PCR, se empleó un termociclador PTC-100 MJ Research, Inc. En la **Tabla 1**, se describen los oli-

gonucleótidos empleados. El control positivo consistió en DNA purificado de una muestra clínica de *U. urealyticum*.

Los productos de la amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa a 2%, revelado con bromuro de etidio a 0.1%, para ser evaluado en un analizador de imágenes (Multimag, Ligth Cabinet, Alpha Innotech).

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleotidos empleados en la técnica de PCR.*

Iniciadores	Secuencia (5' → 3')	Sitio blanco	Tamaño del amplicón
-------------	---------------------	--------------	---------------------

* Para *Ureaplasma urealyticum*.

Resultados

La estandarización del diagnóstico de *U. urealyticum* en LCR se corroboró en primera estancia en la extracción del DNA, ya que la cantidad de DNA libre es muy escasa y los componentes propios del líquido hacen difícil el aislamiento del material genético (**Imagen 1**).

La detección de *U. urealyticum* empleando las condiciones de Blanchard y cols.¹³ indicaron que sólo diez muestras de LCR con el inóculo 10⁴ resultaron positivas, mientras que el resto fueron negativas. Sin embargo, con las condiciones estandarizadas en nuestro laboratorio, en las diluciones 10³, 10², 10¹ la detección fue de 100%, incluyendo el inóculo inicial 10⁴. En la dilución 10⁰, únicamente se identificó al microorganismo en 29 muestras, mientras que 21 fueron negativas. En la **Imagen 2**, se muestra el amplicón de 428 pares de bases obtenido en la PCR.

Los cambios en las condiciones con las que se obtuvo amplificación de DNA con nuestras condiciones son:

- **Paso I.** Desnaturalización inicial a 94°C por tres minutos.
- **Paso II.** Segunda desnaturalización a 94°C por 20 segundos.
- **Paso III.** Alineación a 60°C por 60 segundos.

- **Paso IV.** Extensión a 72°C por 60 segundos.

Se repiten los pasos del II al IV por 34 ciclos más. Finalmente se lleva a cabo una extensión final a 72°C durante cinco minutos. Para establecer muestras clínicas adecuadas para la obtención de DNA, se plantea la posibilidad de mantener las muestras en congelación a -70°C, o de inicio inocular parte del LCR (0.5 ml) en medio caldo urea e incubando las muestras a 37°C.

Discusión

La PCR es una prueba de gran utilidad en cuestiones de diagnóstico microbiológico. A pesar de ello, los reportes del uso de PCR para la identificación de *U. urealyticum* han mostrado una mayor sensibilidad y especificidad en relación con el cultivo y con la ventaja de proporcionar resultados en menor tiempo.^{4,13-15}

Hasta la fecha, la detección de *U. urealyticum* ha sido examinada a muestras de aspirados bronquiales, secreciones cervicales, líquido amniótico, material peritoneal, tejido placentario y endometrial, entre otros.

A pesar de la escasa literatura en el diagnóstico de neuroinfección mediante PCR como una prueba útil, la información sólo se dirige a reportes de casos clínicos, en donde se sugiere que la infección por este microorganismo en sistema nervioso central es más común de lo que se piensa; sin embargo, las condiciones para su cultivo son complicadas, por ser un microorganismo carente de pared celular y con alta sensibilidad a los cambios de osmolaridad y con necesidades nutricionales muy estrictas.³⁻¹¹

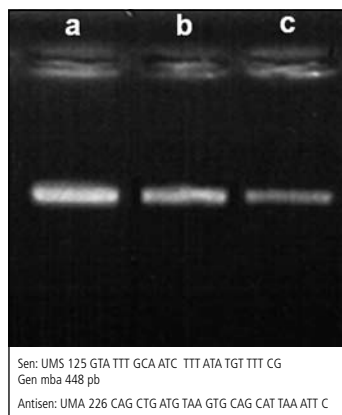


Imagen 1. Integridad del DNA en muestras de líquido cefalorraquídeo inoculadas con una cepa clínica de *Ureaplasma urealyticum*. (a) Inóculo inicial de 10⁴ UFC/mL. (b) Dilución con inóculo 10³ UFC/mL. (c) Dilución con inóculo 10² UFC/mL.

Los resultados obtenidos empleando las condiciones de Blanchard y cols.¹³ difieren de los nuestros en gran medida, y esto pudiera deberse a que estos investigadores tienen estandarizada su PCR para aspirados bronquiales y no para LCR. También existe la posibilidad de la presencia de inhibidores,^{15,16} en este caso, el almacenamiento de las muestras en temperatura de -70° C pudiera ser la causa de que éstos no estuvieran presentes en las muestras que utilizamos; además, el hecho de que la inoculación directa puede ser un factor que favorezca la extracción de DNA, ya que se realizó mediante inoculaciones controladas y por nuestros resultados esto no se descarta, por lo que la técnica de centrifugado y de conservación debe ser siempre estricta tratando de separar el material genético de inmediato. Esta dificultad se vio reflejada en nuestro estudio, ya que en un inicio, a pesar de que se logró amplificar DNA en algunos experimentos, no fue constante, hasta que se hicieron los cambios ya comentados.

La diferencia importante en las condiciones de la amplificación pudiera radicar en el hecho de que Blanchard y cols.¹³ emplearon 62°C en la alineación de la cadena, mientras que nosotros utilizamos 60° C. Esta diferencia de dos grados es muy significativa en la PCR, ya que esto implica

que no haya amplificación, que pudiera ser el caso. Hasta la fecha la estandarización de la PCR aparece en la literatura en forma frecuente para múltiples muestras clínicas ya mencionadas con anterioridad; sin embargo, para LCR no existe, la explicación al respecto es la dudosa participación patológica que algunos artículos han reportado de este microorganismo, algunos sugieren que su aislamiento no tiene ningún valor diagnóstico, y por lo tanto, no es importante dar tratamiento en caso de identificarlo.

Al lograr la estandarización, consideramos que los resultados que se puedan generar lograrán una detección oportuna de *U. urealyticum* para el mejor manejo de recién nacidos con sospecha de neuroinfección en LCR. Para lo cual se está realizando en la actualidad, la validación con muestras clínicas de pacientes con sospecha de meningitis, por lo que la parte clínica será de importancia, incluso en el estudio piloto.

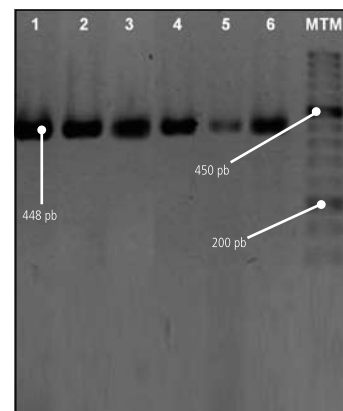


Imagen 2. Productos de amplificación por PCR de los líquidos cefalorraquídeos inoculados con una cepa clínica de *Ureaplasma urealyticum* a diferentes concentraciones. (1) 10⁴ UFC/mL. (2) 10³ UFC/mL. (3) 10² UFC/mL. (4) 10¹ UFC/mL. (5) 10⁰ UFC/mL. (6) Control Positivo. (MTM) Marcador de Tamaño Molecular.

Referencias

- Alfa M, Embee J, Degagne P. Transmission of *Ureaplasma urealyticum* from mothers to full and preterm infants. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14:341-5.
- Bowman E, Garland S, Fan E. *Ureaplasma urealyticum* respiratory tract colonization and chronic lung disease in infants with very low birth weight. *Prenat Neonatal Med* 1997;2:42-7.
- Cassel G, Waites KB, Watson H, Crouse D, Harasawa R. *Ureaplasma urealyticum* intrauterine infection: role in prematurity and disease in newborns. *Clin Microbiol* 1993;6:69-87.
- Kong F, Ma Z, James G. Species identification and subtyping of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* using PCR-based assays. *J Clin Microbiol* 2000;38:1175-9.
- Alonso C, Wauters N, Vermeylen D, Muller M, Serruys E. A fatal case of *Mycoplasma hominis* meningoencephalitis in a full-term newborn. *J Clin Microbiol* 1997;35:286-7.
- Wientzen R. Genital mycoplasmas and the pediatrician. *Pediatr Infect Dis J* 1990;9:232-5.
- Siber G, Alpert S, Smith A, Lin J, McCormack W. Neonatal central nervous system infection due to *Mycoplasma hominis*. *J Pediatr* 1977;90:635-7.
- Hjelm E, Jonsell G, Linglof T, Mardh P, Moller B, Sedin G. Meningitis in a new born infant caused by *Mycoplasma hominis*. *Acta Paediatr Scand* 1980;69:415-8.
- Lerer RJ, Kalavsky S. Central nervous system disease associated with *Mycoplasma pneumoniae* infection: report of five cases and review of the literature. *Pediatrics* 1973;52:658-68.
- Lederman MM, Ellner JJ. Presence of antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* in patients with bacterial meningitis. *J Infect Dis* 1983;148:363-5.
- Kleemola M, Kaythi H. Increase in titers of antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* in patients with purulent meningitis. *J Infect Dis* 1982;146:284-8.
- Reyna FJ, Ortiz IF, Plazola CNG, Limón RAE. Meningitis bacteriana en recién nacidos. Experiencia en el Instituto Nacional de Perinatología de 1990 a 1999. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2004;61:402-11.
- Blanchard A, Hentschel J, Duffy L, Baldus K, Cassell GH. Detection of *Ureaplasma urealyticum* by polymerase chain reaction urogenital tract of adults, in amniotic fluid, and in respiratory tract of newborns. *CID* 1993;17(suppl 1):S148-53.
- Glass JL, Lefkowitz EJ, Glass JS, Heiner CR, Chen EY, Cassell H. The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. *Nature* 2000;407:757-62.
- Narita M, Matsuzono Y, Togashi T, Kajii N. DNA diagnosis of central nervous system infection by *Mycoplasma pneumoniae*. *Pediatrics* 1992;90:250-3.
- Razin S, Yegorov D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:1094-1156.