



**Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**

---

Instituto de Ciencias (ICUAP)

Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas

Posgrado en Ciencias Microbiológicas

**“Frecuencia de *Mycoplasma spp* y *Virus De Epstein Barr* en pacientes con diversas enfermedades reumáticas.”**

TESIS

Para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias (Microbiología)

Con orientación en Microbiología Medica

PRESENTA:

**Dulce María Castillo Flores**

ASESORA DE TESIS:

**D.C. María Lilia Cedillo Ramírez**

PUEBLA, PUEBLA

AGOSTO 2020



## Agradecimientos

- N puertas de su prestigiada institución para poder continuar con mi desarrollo profesional.
- Al **Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas** por la oportunidad brindada para el ingreso y la realización de este posgrado; por las herramientas académicas ofrecidas, que en todo momento fueron de excelencia; a su personal administrativo y operativo por todo el apoyo y disponibilidad para la gestión de asuntos solicitados, siempre solidarios y amables.
- Al **Laboratorio de Micoplasmas** por ofrecerme un espacio para la realización de mi proyecto, de manera agradable en todo momento.
- Al **Centro de detección Biomolecular** por permitirme hacer uso de sus instalaciones para complementar mi proyecto, a su personal y compañeros de trabajo, siempre era muy grato realizar mi trabajo ahí.
- Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por la beca otorgada durante los estudios de maestría.
- A la **D.C. María Lilia Cedillo Ramírez** por elegirme como parte de su equipo de trabajo. Por la confianza y todo el apoyo brindado durante todo este proceso, por transmitirme la fascinación por los micoplasmas, por sus enseñanzas en el laboratorio y en el salo de clases, me quedo de usted la gran persona que es, la paz y tranquilidad que trasmite, le aprecio y admiro.
- A la **M.C Elda Carreón Moreno** y al **M.C Sergio Tecpanécatl Xihuitl** por toda la paciencia que tuvieron conmigo, por el apoyo brindado, por su disponibilidad en todo momento, por su tiempo para mostrarme el funcionamiento y cuidado del laboratorio, por hacer de ese lugar un sitio confortable para poder trabajar, agradezco permitirme ser parte de su bonito equipo. Por las excelentes personas que son.

- Al **Cuerpo Académico** del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, a los Doctores y Maestros invitados por compartir sus conocimientos y experiencias. Me llevo lo mejor de ustedes. En especial a la **D.C Margarita María de la Paz Arenas y D.C Rosa del Carmen Rocha** que conjuntamente, fueron parte de mi comité tutorial.
- Al Dr. **David Bañuelos Ramírez** por la contribución y el apoyo para la obtención de las muestras de este trabajo.

## **Dedicatorias**

- A mis Pa´s por ser incondicionales, por amarme y apoyarme siempre, no sería quien soy sin ustedes, por enseñarme los valores del trabajo y la perseverancia, que predicán todos los días, me siento muy orgullosa de ser su hija, Los amo infinitamente.
- A mis hermanos Zu y Edi, por siempre creer en mí, como persona y como profesionalista, no podría tener mejores compañeros en esta vida. Gracias por acompañarme a la distancia, por las llamadas y mensajes que día a día eran un estímulo para seguir.
- A mis sobrinos July, Raulí y Dani, mis motivos para salir adelante, mi reconforte, mi felicidad, mi recarga de energía para la semana, son mi adoración.
- A mi compañero de viaje

A ti Borre, sin ti esto no sería posible, porque decidimos emprender lejos de casa, Gracias porque siempre me apoyas en las decisiones que tomo, dándome una palabra cuerda para mi locura, una palabra de ánimo cuando más desesperada me encuentro, por esas caminatas donde no paraba de hablar, amo caminar a tu lado, por siempre creer en mí y echarme porras, a tu familia por todo el apoyo que nos brindan siempre , gracias por todo el amor, comprensión, compañía, felicidad y adversidades que hemos pasado juntos en este viaje que es la vida. Te amo

- A mis Perrhijos, Rocko y Max, mis compañeros incondicionales, mi felicidad, mis consentidos, mis chiquitos me han enseñado el amor verdadero, no imagino una vida sin ustedes, formamos una gran familia.
- A las personas que encontré en esta ciudad durante el camino a este proyecto que me abrieron las puertas de su vida, de sus casas y me ofrecieron su amistad y conocimientos, a la familia Juárez Jiménez (Sr. George, Miss Yami, Jessi, Jorge Luis), a la familia Salomon Carreto (Miss Con, Miss Lu, Don Rafa, Angelita+), Miss Rosy Limón, gracias por ser mi familia poblana, por los buenos momentos, por la compañía, uno vuelve a donde es feliz.
- A los amigos que hice en el camino Jaz, Mon, Carlos, gracias por las risas y momentos, a mis compañeros de laboratorio, Vale, Dulce 1 (la consentida), Gil, Pili, Josué y los que me falte por mencionar, por los conocimientos compartidos consejos y buenos ratos.
- Ha sido un trabajo conjunto sin cada una de estas piezas esto no sería posible, ¡Gracias a todos por todo!
- Para quienes creían en mí incondicionalmente y ya no están; A mis abuelitas, Elsitita, estabas feliz por esto, Tía Conchis siempre confiabas en mí, les echo mucho de menos.

**“Era como un nuevo mundo abierto para mí, el mundo de la ciencia, que por fin se me permitió conocer en toda libertad.”**

*Marie Curie*

# Contenido

Agradecimientos .....	1
Dedicatorias .....	4
Contenido.....	6
Indicé de tablas .....	8
Índice Ilustraciones .....	9
1.- RESUMEN .....	13
2.- Introducción.....	14
2.1 Enfermedades Reumáticas.....	14
2.1.1 Osteoartritis (OA) .....	16
2.1.2 Espondilitis Anquilosante (EA) .....	17
2.1.3 Artritis Reumatoide (AR) .....	17
2.1.4 Artritis Reactiva (ARe) .....	18
2.2 Microorganismos en Estudio.....	19
2.2.1 Mycoplasma spp.....	19
2.2.3 Virus Epstein Barr .....	24
2.3 Relación entre microorganismos y articulaciones .....	29
3. ANTECEDENTES .....	30
4. JUSTIFICACIÓN.....	36
5. HIPOTESIS .....	36
6.1 Objetivo general.....	37
6.2 Objetivos particulares .....	37
7. ESTRATEGIA METODOLÓGICA.....	38
8. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	39
8.1 Criterios de Inclusión.....	39
8.1.1 Grupo de estudio.....	39
8.2 Criterios de Exclusión .....	39
8.3 Criterios Eliminación .....	39

8.4 Consideraciones Éticas .....	39
9. MATERIALES Y METODOS.....	39
9.1 Sujetos de Estudio .....	39
9.2 Especímenes.....	40
9.3 Recolección de muestras.....	40
9.4 Identificación por cultivo de <i>mycoplasma spp</i> .....	41
9.5 identificación microbiológica de otras especies bacterianas.....	41
9.6 Extracción ADN de muestras clínicas .....	41
9.7 Extracción ADN de Cultivos de Caldo Eaton.....	42
9.8 Cuantificación y determinación de concentración DNA .....	42
9.9 Determinación por PCR .....	42
10. Resultados .....	49
10.1 Sujetos de estudios .....	49
10.2 Detección de <i>Mycoplasma spp</i> por medio de cultivo .....	51
10.3 Identificación microbiológica de otras especies bacterianas.....	53
10.4 Identificación de <i>Mycoplasma Spp</i> por PCR punto final. ....	53
10.5 Comparación de medios de cultivo agar y caldo Eaton y detección por PCR para búsqueda de <i>Mycoplasma Spp</i> .....	55
10.6 Identificación de <i>Mycoplasma fermentans</i> por PCR punto final .....	57
10.7 Identificación de Virus de Epstein Barr por PCR punto final.....	58
11. Discusión .....	59
12. Conclusiones.....	63
13. Perspectivas .....	64
14. Bibliografía .....	65

## Indicé de tablas

Tabla 1 Clasificación enfermedades Reumáticas.....	15
Tabla 2 Secuencia de iniciadores para Mycoplasma spp y M fermentans .....	43
Tabla 3 Componentes y concentraciones utilizados para las PCR realizadas para determinación de Mycoplasma spp y M. fermentans .....	45
Tabla 4 Secuencias de iniciadores para Virus de Epstein Barr .....	46
Tabla 5 Componentes y concentraciones utilizados para las PCR realizadas para determinación de Virus de Epstein Barr .....	48
Tabla 6 Muestras positivas en identificación de Mycoplasma spp .....	54
Tabla 7 Comparación de métodos de identificación Mycoplasma spp .....	55
Tabla 8.. Comparación de métodos de identificación Mycoplasma spp posterior a reamplificación de muestras positivas a Agar Eaton. ....	56

## Índice Ilustraciones

Ilustración 1 Dinámica de la aparición de títulos de anticuerpos y marcadores moleculares para ser detectado por serología o técnica de PCR .....	29
Ilustración 2 Alineamiento secuencia <i>Mycoplasma spp</i> y <i>M. Fermentans</i> con oligonucleótidos utilizados.....	44
Ilustración 3 Condiciones de temperatura y tiempo utilizadas para amplificación de <i>Mycoplasma spp</i> y <i>M. fermentans</i> .....	46
Ilustración 4 Alineamiento secuencia de Virus de Epstein Barr con oligonucleótidos utilizados .....	47
Ilustración 5 Condiciones de temperatura y tiempo utilizadas para amplificación de Virus de Epstein Barr .....	49
Ilustración 6 Graficas de la relación del número de muestras recibidas por enfermedad reumática y sus porcentajes.....	50
Ilustración 7 Muestras positivas en caldo y Agar Eaton .....	51
Ilustración 8 Graficas de relación Muestras positivas en caldo y Agar Eaton con enfermedad reumática y sus porcentajes.....	52
Ilustración 9 Identificación otras especies bacterianas en Agar sangre de cordero .....	53
Ilustración 10 Visualización de productos PCR por corrimiento electroforético en gel de agarosa <i>Mycoplasma spp</i> .....	54
Ilustración 11 Visualización de productos PCR por corrimiento electroforético en gel de agarosa de <i>Mycoplasma fermentans</i> .....	57
Ilustración 12 Visualización de productos PCR por corrimiento electroforético en gel de agarosa de Virus de Epstein Barr .....	58

## ABREVIATURAS

ADN/DNA	Ácido Desoxirribonucleico
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
AR	Artritis Reumatoide
ARN/RNA	Ácido ribonucleico
ARe	Artritis Reactiva
ATP	Adenosín Trifosfato
BrEt	Bromuro de etidio
°C	Grados centígrados
CE	Cuerpo Elemental
CMV	Citomegalovirus
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
COGS	Clúster de grupos ortólogos de proteínas
COMC	Complejo proteico de membrana externa rico en residuos de Cisteína.
CPA	Células presentadoras de Antígenos
CR	Cuerpo Reticular
CSF2	Factor estimulante de colonias
dNTP	Deoxi-nucleótido Trifosfato
EA	Espondilitis Anquilosante
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMBL- EBI	Instituto Europeo de Bioinformática.
Enf.	Enfermedad
FA	Formas Aberrantes
g	gramos
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
HLA B-27	Antígeno leucocitario humano B27
HLA-DR	Antígeno leucocitario humano isotipo DR

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogeno
HPS	Proteínas de choque térmico
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleucina
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
Kb	Kilo bases
KDa	Kilo Dalton
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
LPS	Lipopolisacárido
mg	miligramos
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
min	minutos
ml	mililitro
μl	Micro litro
MOMP	Proteínas principales membrana externa
Mpm	marcador e peso molecular
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
NO	Óxido nítrico
OA	Osteoartritis / Osteoartrosis
O <sub>2</sub>	Superóxido
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF's	Marcos de Lectura Abiertos
PBP	Proteínas de unión a Penicilina
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E 2
Pb	pares de bases
PBS	Tampón de fosfatos salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de iones hidrogeno

PMP	Proteínas polimórficas de membrana
PPLO	Organismos similares al agente causal de pleuroneumonía (Pleuropneumonia like organisms)
QKRAA	Secuencia aminoácidos Glutamina-Lisina-Arginina-Alanina-Alanina
rpm	revoluciones por minuto
rRNA	ARN ribosomal
RT- PCR	Reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa
Spp.	Especies
Sx	Síndrome
TAE	Tris Acetato EDTA
TarP	Fosfoproteína traslocada reclutadora actina
TGF- $\beta$	Factor transformador de crecimiento -beta
Tm	Temperature melting (Temperatura de fusión)
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TTSSIII	Sistema de secreción tipo III
VEB	Virus Epstein Barr
$\mu$ m	Micras

## 1.- RESUMEN

Las enfermedades reumáticas son enfermedades del sistema locomotor que no son secundarias a un traumatismo, son muy prevalentes, considerando que más de la mitad de la población se ve afectada con más frecuencia en mujeres, estas originan elevados costos por atención médica primaria y consumo de analgésicos y antiinflamatorios, deterioran la calidad de vida, generan altas tasas de incapacidad laboral y son causa de muerte prematura.

Existen múltiples etiologías relacionadas al origen de este grupo de enfermedades, no obstante en últimas fechas ha tomado relevancia la asociación de la aparición y/o exacerbación de las enfermedades con microorganismos, la intención del estudio es la detección de *Mycoplasma* y Virus de Epstein Barr en líquidos corporales de pacientes con distintas enfermedades reumáticas.

Se hizo el análisis de 41 muestras, las cuales fueron analizadas para la identificación de *Mycoplasma spp* por Cultivo Eaton (Caldo y agar), PCR; identificación de *M. Fermentans* por PCR. Identificación Virus Epstein Barr por PCR.

Se detectó el 17 % de muestras positivas en Caldo de Cultivo Eaton, 29.2% positivas en cultivo agar, En la detección por PCR se obtuvo 7.6 % de positivas en muestras de líquido sinovial, 8% positivas en las realizadas a partir de Caldo Eaton y el 0.92% positivas en sangre. Se efectuó una comparación de los resultados obtenidos de los medios de cultivo y la detección por PCR punto final, el 39 % de las muestras fueron confirmadas por los 4 métodos de detección, a estas se les tipifica *M. fermentans* donde solo el 15 % dieron positivo a este género. En el caso de Virus de Epstein Barr se consideraron 40 muestras, donde solo el 10 % dio un resultado positivo.

Se puede comprobar que si hay presencia de microorganismos en líquidos corporales de pacientes con enfermedades reumáticas predominando los mycoplasmas en comparación con los microorganismos analizados en este estudio.

## **2.- Introducción**

### **2.1 Enfermedades Reumáticas**

Las enfermedades reumáticas son enfermedades del sistema musculoesquelético (huesos, músculos, articulaciones), comúnmente se refiere a ellas como el conjunto de enfermedades inflamatorias y degenerativas que afectan a las articulaciones y sus estructuras vecinas.

Los trastornos reumáticos crónicos constituyen una carga social y económica considerable, se presentan en 1 de 5 personas a nivel mundial con predominio en el sexo femenino con una relación 3:1, causan el 33% de consultas de primer nivel de atención a la salud y 20 % del consumo de AINES, para el año 2008 este tipo de enfermedades representaban el 1,2 % gasto total del IMSS, son causantes del 40-50 % de incapacidades laborales, 50 % laboral temporal y 50 % laboral permanente (Asociación Mexicana de Familiares y Pacientes con Artritis Reumatoide A.C. (AMEPAR), 2020), originan costos médicos elevados, deterioro de la calidad de vida, y son responsables de muerte prematura. (Duran, M., González-Haba, E., Herranz, A., & Pern, S. (2002)).

Como parte de la anatomía las articulaciones están conformadas por una capsula articular que presenta una membrana sinovial compuesta por sinoviocitos sobre una red de colágeno que presentan buena irrigación sanguínea y linfática además de buena inervación, es la encargada de la producción y secreción de líquido sinovial cuya función es la lubricación, protección mecánica contra traumatismos, contiene células fagocíticas que remueven microorganismos y restos por desgaste articular (Gutierrez, 2004). La inflamación articular será una respuesta defensiva de la membrana sinovial ante diferentes tipos de agresiones. (Martínez Larrarte, Reyes, & Prada Hernandez, 2007)

Son múltiples los agentes lesivos que pueden producir inflamación de la membrana sinovial, entre las principales etiologías encontramos a los agentes físicos como la edad, envejecimiento; agentes químicos causado por la acumulación de cristales de ácido úrico, pirofosfato dicálcico, hidroxapatita, o

esteroides; Agentes biológicos donde encontramos a virus, bacterias y hongos; e inmunológicos originado por inmunocomplejos circulantes o formados in situ.

Cínicamente se manifiestan con el síndrome inflamatorio articular, cursando con dolor como síntoma fundamental, aumento de temperatura, tumor o aumento de volumen, hiperemia, pérdida de la función, asimismo pueden presentarse síntomas musculo esqueléticos como rigidez, debilidad, parestesias, limitación para la movilidad y otros acorde a la etiología de la enfermedad. (Martínez Larrarte, Reyes, & Prada Hernandez, 2007)

Existen más de 200 enfermedades reumáticas, La Fundación Española de Reumatología realiza una clasificación dependiente de la etiología, en la tabla N°1 pueden observarse las categorías y los ejemplos más destacados.

Tabla 1 Clasificación enfermedades Reumáticas

ENFERMEDAD	EJEMPLO
1. Enfermedades del tejido conectivo	AR, AR juvenil, LES, miopatías inflamatorias, Vasculitis, Sx Sjögren.
2. Espondiloartropatías seronegativas	EA, Sx Reiter, Artritis Psoriasica, Asociada a enfermedades Intestinales.
3. Osteoartritis	Artrosis.
4. Sx Reumáticos asociados a agentes infecciosos	Artritis Reactiva, fiebre reumática, endocarditis.
5. Enfermedades metabólicas y endocrinas	Enfermedad por depósito de cristales (hiperuricemia), amiloidosis, hemofilia, Sx Marfan, Sx Ehlers-Danlos.
6. Neoplasias	Sarcomas, osteocondromatosis.
7. Enfermedades Neurovasculares	Artropatía de Charcot, Sx túnel del carpo, Radiculopatía

<b>8. Trastornos óseos y del cartílago</b>	Osteoporosis, osteomalacia, osteolisis, necrosis avascular, displasia de cadera
<b>9. Sx Extraarticulares</b>	Lesiones yuxtaarticulares, trastorno disco intervertebral, Sx dolorosos misceláneos (fibromialgia)
<b>10. Padecimientos misceláneos asociados a manifestaciones reumáticas</b>	Deficiencias vitamínicas, sarcoidosis, hepatitis crónica

Fuente: (Fundación Española Reumatología, 2020)

Las enfermedades reumáticas afectan aproximadamente a 10 millones de personas en México, siendo la osteoartrosis y artritis reumatoide las más comunes afectando entre 1 y 8 millones de personas respectivamente. (Asociación Mexicana de Familiares y Pacientes con Artritis Reumatoide A.C. (AMEPAR) , 2020) Serán de relevancia en este estudio las enfermedades reumáticas del tejido conectivo, osteoartritis y las asociadas a agentes infecciosos, se puso atención en los padecimientos más frecuentes de acuerdo a las muestras recibidas.

### **2.1.1 Osteoartritis (OA)**

Se trata de una enfermedad degenerativa de las articulaciones, con deterioro progresivo del cartílago, donde la afección primaria es en tejidos blandos, con daño posterior en huesos y articulaciones sinoviales, afecta a todas las articulaciones, entre los factores de riesgo se consideran los genéticos ( en 50 % de los casos); genero, se presenta predominante en mujeres; edad, con un aumento progresivo a partir de los 45 años, obesidad, traumatismos previos, actividad laboral, densidad ósea, menopausia, tabaquismo y avitaminosis. (Belmonte, Castellano, Román, & Rosas, 2013)

La fisiopatología es compleja ya que la etiología es multifactorial, como factores metabólicos, locales y genéticos, involucra un proceso de deterioro del cartílago con reacción proliferativa del hueso subcondral e información de la membrana sinovial. (Belmonte, Castellano, Román, & Rosas, 2013)

El trastorno reside en una disfunción de causa desconocida del metabolismo de los condrocitos, con frecuencia hay aumento de mediadores de inflamación como prostaglandinas y citocinas como PGE<sub>2</sub>, IL-1 y TNF -  $\alpha$ , NO, favoreciendo el proceso degenerativo del cartílago, aunque en menor cantidad que la artritis reumatoide. (Belmonte, Castellano, Román, & Rosas, 2013)

Las manifestaciones clínicas son: el dolor articular, limitación del movimiento, chasquido, tumefacción, deformidad, inestabilidad, rigidez y derrame sinovial, dependerá de la articulación afectada y del momento evolutivo. Aunque el curso de la enfermedad es lento y progresivo se presentan periodos de agudización de la enfermedad.

### **2.1.2 Espondilitis Anquilosante (EA)**

Se refiere a la enfermedad caracterizada por la inflamación de las articulaciones del esqueleto axial y extremidades, se encuentra relacionada con el HLAB27, se trata de una enfermedad sistémica crónica, de causa idiopática, el proceso inflamatorio causa una osificación condral, anquilosis y manifestaciones extraarticulares como la uveítis, psoriasis y enfermedad inflamatoria intestinal.

Se presenta con frecuencia en la tercera década de la vida, con un pico alrededor de los 25 años, es más frecuente en el sexo masculino, de comienzo insidioso, mejora con el ejercicio y es mayor la sintomatología durante la noche, aunque el curso de la enfermedad es variable, tiende a una limitación permanente. (Fernández Carballido, Martín Domenech, & San Martín )

### **2.1.3 Artritis Reumatoide (AR)**

Enfermedad inflamatoria sistémica y crónica de deterioro progresivo, de predominio articular y de etiología desconocida, existe predisposición genética para el padecimiento de esta enfermedad, se ha asociado a la presencia de un antígeno exógeno y/o autoantígenos, ya que se ha demostrado en algunos casos con la asociación con el producto génico del complejo principal de histocompatibilidad de clase II, el HLA-DR, también se ha asociado a la presencia de agentes infecciosos, como el virus de Epstein Barr y algunas bacterias, los

antígenos provocan una respuesta inmune que deriva en una reacción inflamatoria mediada por células plasmáticas, linfocitos T y macrófagos, entre los anticuerpos formados destaca el factor reumatoide presentes en 2/3 partes de los pacientes, habrá producción de citocinas que incluyen IL-2, IL-6, GM-CSF, TNF-  $\alpha$ , TGF- $\beta$  que explicaran las manifestaciones locales y sistémicas de la enfermedad.

La lesión característica es una sinovitis inflamatoria persistente que articulaciónes periféricas con distribución simétrica, produciendo destrucción del cartilago, erosión ósea y deformidad en fases avanzadas, la sintomatología aparecerá de forma gradual con una afectación poliarticular de inicio agudo, que se agrava con el movimiento, presenta rigidez matutina y se acompañará de sintomatología general como fiebre y manifestaciones extraarticulares como nódulos, vasculitis, manifestaciones pleuropulmonares. (Duran, González-Haba, Herranz, & Pern, 2002)

#### **2.1.4 Artritis Reactiva (ARE)**

Consiste en la inflamación aséptica de la membrana sinovial, secundaria a una infección a distancia, habitualmente de localización gastrointestinal, genitourinaria, vías respiratorias, meninges o piel. El Sx de Reiter fue descrito como una triada conformada por artritis, uretritis y conjuntivitis, puede acompañarse de lesiones cutáneas, uveítis, afecciones cardiacas y neurológicas. Tiene predisposición genética y se encuentra asociado a HLA B27 presente entre el 50% y 85 % de los casos, suele presentarse concomitante con Espondiloartropatías.

Entre los agentes etiológicos encontramos a *Chlamydia trachomatis*, *Salmonella entérica*, *Ureaplasma urealyticum*, *Yersinia enterocolitica* entre los posibles *Mycoplasma spp.* o *Bacillus cereus* o *Meningococo* o *Propionebacterium acnés* o *Bartonella henselae* o *Pseudomonas spp.*, *Virus Epstein Barr*, *Rickettsia*. Afecta a adultos jóvenes de entre 20 y 40 años, será más frecuente en hombres las Are de origen genitourinario, la presencia de HLA B27 aumentara la susceptibilidad, los mecanismos patogénicos son desconocidos, se ha mencionado la similitud de los péptidos microbianos y el HLA B27 que podría desencadenar un daño sistémico de tipo autoinmune (mimetismo molecular), o

una tolerancia del huésped respecto al microorganismo, además se han detectado antígenos bacterianos LPS, DNA bacteriano e incluso RNA en líquido sinovial y membrana sinovial de estos pacientes, es posible la persistencia del microorganismo intracelular viable o dentro de la articulación, torrente sanguíneo y sistema retículo endotelial. (Belmonte, Castellano, Román, & Rosas, 2013)

## **2.2 Microorganismos en Estudio**

### **2.2.1 Mycoplasma spp**

Las bacterias del género micoplasma, se encuentran dentro del filo *ternicutes*, pertenecen a la clase *Mollicutes*, orden *Mycoplasmataceae*, género *Mycoplasma* se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, presenta un creciente número de especies que se acerca a 200, de las cuales algunas se comportan como comensales y otras como patógenos de humanos, animales y plantas. Se han aislado en el hombre 12 especies del género micoplasma, entre ellas *M. pneumoniae*, *M. fermentans*, *M. salivarium*, *M. hominis*, *M. penetrans*. (Acosta Boga, Codina Grau, Matas Andreu, & Meseguer Peinado, 2011)

Son los microorganismos más pequeños de vida libre capaces de auto replicarse, su tamaño va desde 0.2-0.8  $\mu\text{m}$ , fueron descritos por primera vez por Nocard y Roux en 1898, quienes demostraron pleuroneumonía en ganados causada por estos microorganismos, fue llamado inicialmente agente de Eaton o PPLO, en 1960 se decide finalmente llamarle *Mycoplasma Pneumoniae*. (EcuRed contributors, 2017)

*Mycoplasma fermentans* posee un genoma de aproximadamente 1,100kb se trata de un patógeno que fue aislado alrededor de 1950's, en el tracto genitourinario humano (Instituto Valenciano de Microbiología, 2018), se conoce micoplasma invasivo que puede adherirse a células humanas, tiene potencial para la invasión de células respiratoria, genitales y gastrointestinales donde se ha asociado a procesos reumáticos como la Artritis Reactiva, (Rivera Tapia J. A., Cedillo Ramirez, Bermejo Zapata, & Giondo-Cerezo, 2006),

### 2.2.1.1 Genoma

El genoma de micoplasma oscila entre 580- 2200 kb variables dependiendo del género, siendo *Mycoplasma genitalium* el de menor tamaño, posee un contenido G-C característicamente bajo de 18-40% con distribución desigual (DBpedia, 2010), han presentado una reducción del tamaño de su genoma, ya que presentan secuencias repetitivas de importancia evolutiva, además de mecanismos de supervivencia como lo es el mimetismo con antígenos del huésped, supervivencia dentro de células fagocíticas y evasión del sistema inmune, que permite que sea un excelente parásito. (Acosta Boga, Codina Grau, Matas Andreu, & Meseguer Peinado, 2011)

El análisis genómico revela la ausencia de genes implicados en la síntesis de aminoácidos, cofactores, vitaminas, precursores de ácidos nucleicos, ácidos grasos, colesterol que dependen del aporte exógeno proveniente de células del hospedero. La reducción genómica estará relacionada con la ausencia de vías metabólicas, por lo que es considerado como un parásito obligatorio, requiriendo de metabolitos exógenos esenciales que darán como resultado el daño de los tejidos que colonizan. (Gwynedd A. Benders, 2005)

La patogenicidad se asocia con la producción de exotoxinas, fosfolipasas, proteasas, hemolisinas, ureasas y radicales libres, además de que cuenta con estrategias para la evasión del sistema inmune por medio de la variación antigénica. (Rivera & Cedillo, Comparación genómica en micoplasmas de interés médico, 2006)

Los mecanismos de evasión de la respuesta inmune, las moléculas antigénicas de superficie pueden ser modificadas según la especie de micoplasma, generando heterogeneidad fenotípica.

Es de importancia mencionar que además de presentar un genoma reducido, contiene un porcentaje considerable de proteínas no clasificadas en COGS, lo que sugiere adaptabilidad que permitirá evolución (Rivera & Cedillo, Comparación genómica en micoplasmas de interés médico, 2006)

### **2.2.1.2 Pared Celular y Membrana Plasmática**

Una de las características de los mollicutes es que carecen de pared celular, únicamente cuentan con membrana plasmática, a continuación se mencionaran los componentes principales de esta:

Proteínas de membrana representan más de 2/3 de la membrana, el resto son lípidos (Razin, 1998), se encuentran divididas en dos categorías: las proteínas integrales que se encuentran dentro de membrana y las proteínas periféricas adheridas por uniones electroestáticas, dentro de esta se encuentran las lipoproteínas también llamadas proteínas asociadas a lípidos de la membrana o LAMP que son las más abundantes, se encuentran entre los antígenos más dominantes, estos son reconocidos por el sistema inmune innato a través de los receptores tipo Toll 2 y 6 (You, Zeng, & Wu, 2006), dependiendo de la especie pueden ser codificadas por uno o más genes, estas sufren variaciones antigénicas, que como se mencionó permiten la adaptabilidad del microorganismo, por medio de la evasión del sistema inmune.

La membrana plasmática se compondrá de fosfolípidos, glicolípidos y lípidos neutros (principalmente colesterol no esterificado) que constituyen el 35-50% de la fracción lipídica, y los lípidos polares constituyen el 50-65 %, ya que los micoplasmas son parcial o totalmente incapaces de la síntesis de ácidos grasos, por lo que una peculiaridad será el requerimiento de colesterol para el crecimiento, que constituirá el núcleo hidrofóbico de la membrana, por lo que se debe suministrar al menos un ácido graso exógeno en el medio de crecimiento. (Kornspan & Rottem, 2012)

La forma de internalizar el colesterol a la membrana será tomándolo directamente del hospedador, las lipoproteínas, incorporan los fosfolípidos como la esfingomielina sin modificaciones de su estructura y la fosfatidilcolina será tomada del medio al adicionarle ácidos grasos a su estructura.

El carecer de una pared celular rígida permite en los micoplasmas un contacto íntimo con la membrana de sus células huéspedes; esta capacidad ha

sido evidenciada por medio de microscopia electrónica y métodos de fluorescencia. La capacidad de fusión depende esencialmente del contenido de colesterol y de la presencia de una fracción lípido polar en las membranas de los micoplasmas. (Kornspan & Rottem, 2012)

### **2.2.1.3 Características especiales**

#### **2.2.1.3.1 Metabolismo**

El genoma pequeño de los micoplasmas impide la posesión de actividades metabólicas, las cuales están asociadas a la generación de energía, más que con la provisión de sustratos, este tipo de microorganismos carecen de ciclo de ácido tricarboxílico, no tiene quinonas ni citocromos descartando la fosforilación oxidativa como mecanismo de ATP, según su capacidad de metabolizar carbohidratos se dividen en fermentativos y no fermentativos. (Lluch, 2010)

Los miembros el grupo fermentativo, *M. Pneumoniae*, *M. genitalium*, *M. fermentans*, *M. penetrans*, *M. pirum*, producen ácidos a partir de carbohidratos, disminuyendo el pH del medio de crecimiento, la mayoría de micoplasmas no fermentadores y algunas especies fermentativas, *M. hominis*, *M. ovale*, *M. salivarium*, *M. fermentans*, *M. penetrans*, *M. pirum* poseen la vía de la arginina dihidrolasa que da como resultado orinita, ATP, CO<sub>2</sub> y amoniaco elevado el ph del medio de cultivo. Los mecanismos generadores de energía dan lugar a una muy baja producción de ATP aunque producen cantidades grandes de productos metabólicos finales, cuyos sustratos son tomados de los tejidos del hospedador. (Acosta Boga, Codina Grau, Matas Andreu, & Meseguer Peinado, 2011).

#### **2.2.1.3.2 Factores de virulencia**

Las infecciones por micoplasmas muy pocas veces son del tipo fulminante, sino que siguen un curso crónico, aunque las bases de la patogenia no son bien conocidas se han descrito factores de virulencia, que actúan en el proceso patogénico, como son:

- a) Estructuras de adherencia y penetración celular: a pesar de su economización genética, se dedica un número significativo de genes a

proteínas de membrana que evolucionan a adhesinas y estructuras especializadas para la adherencia, empleando una estructura llamada organelo terminal o de adherencia. (Cervantes, 2009)

- b) Secreción de enzimas como fosfolipasas A1, A2 y C
- c) Secreción de  $H_2O_2$  y  $O_2^-$  (anión superóxido) responsables de la lesión oxidativa de la membrana de la célula hospedadora
- d) Presencia de fracciones proteicas letales
- e) Variaciones antigénicas y de fase, para la evasión de la respuesta inmune, con la variación de principales antígenos y lipoproteínas de la superficie de la membrana, producto del reordenamiento genético de las secuencias repetidas.
- f) ) Capacidad de penetración intracelular con distribución citoplásmica y en las regiones perinucleares de una amplia gama de tipos de células humanas.

(Acosta Boga, Codina Grau, Matas Andreu, & Meseguer Peinado, 2011)

#### **2.2.1.4 Respuesta inmune desencadenada por *mycoplasma***

La interacción entre micoplasma y sistema inmune del hospedero implica reacciones específicas e inespecíficas inducidas por el microorganismo, los mecanismos específicos incluyen la producción de anticuerpos antimicoplasmiales sistémicos y locales de diferentes clases, estimulación de inmunidad celular, opsonización y fagocitosis de organismos, estas desempeña un papel en el desarrollo de las lesiones y exacerbación de la enfermedad producida por micoplasma por su capacidad estimulante o supresora varias especies de linfocitos de forma policlonal e inespecífica, además se ejerce un efecto inmunomodulador específicos sobre células del sistema inmune, Inducción de citocinas por activación de macrófagos monocitos, células epiteliales y otras células, dando lugar a la expresión y secreción de las principales citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-16, IL-18, etc.) así como interferón- $\gamma$ . (Acosta Boga, Codina Grau, Matas Andreu, & Meseguer Peinado, 2011)

La capacidad de los micoplasmas para inmunomodular contribuye a sus propiedades patógenas, lo que permite la evasión o supresión mecanismos del sistema inmune.

La supresión inmunitaria Inducida por micoplasmas se basa en el agotamiento del aminoácido L- arginina que induce efectos inmunosupresores de las células, citotoxicidad de células linfoides y en el caso de *M fermentans* llega a presentarse una endotoxina, causando citotoxicidad de linfocitos supresión directa de células inmunes donde algunas especies disminuyen significativamente la estimulación de linfocitos por antígenos micoplasmáticos. (Razin, 1998)

Con la activación de las respuestas humoral y celular los micoplasmas tendrá la capacidad de evadir la respuesta, inmune, exacerbarla o suprimirla, su habilidad en la modulación de la respuesta inmune permite que sean factibles las infecciones crónicas, crónicas agudizadas, reacciones de hipersensibilidad y autoinmunidad.

Se han asociado las manifestaciones autoinmunes a la tolerancia de los antígenos propios, estos incluyen el intercambio de determinantes antigénicos por el agente infeccioso y los tejidos del huésped y/o antígenos modificados que estimulan la respuesta inmune, la activación de células T autoreactivas como resultado de un estímulo inespecífico o por falla en los mecanismos de regulación además de la estimulación e los linfocitos B por activadores policlonales conducen al desarrollo de manifestaciones autoinmunes. (Razin, 1998).

### **2.2.3 Virus Epstein Barr**

El virus de Epstein Barr (VEB) pertenece a la familia Herpesviridae, subfamilia *gammaherpesvirinae* y genero *Lymphocryptovirus*, se trata de un Herpesvirus humano tipo 4, es transmitido principalmente por saliva, trasplante medula ósea, transmisión sexual, transfusión sanguínea, ingresa a orofaringe, es capaz de infectar tanto a células epiteliales, como a linfocitos B Naive, puede considerarse que tiene una diseminación linfática, sistema retículo endotelial y hematogena.

El VEB presenta restricción de rangos en las células huésped ya que solo infecta humanos y algunos primates experimentales, esta restricción puede estar determinada por el receptor del virus en la membrana, el cual está asociado al receptor C3 en linfocitos B. Distribuido por transmisión horizontal. La edad varía sustancialmente a escala global, dependerá de las condiciones de desarrollo socioeconómico (Hábitos higiénicos dietéticos y habitacionales). (Tinoco Racero, Caro Gómez , Rodriguez Leal, & Lopez Tinoco , 2014)

En la mayor parte de los casos la infección primaria por este virus es asintomática, infecta entre el 60% y el 95% de la población adulta. Actualmente se conocen dos cepas predominantes la tipo 1 o A y la tipo 2 o B, en base a las características biológicas, Si el balance entre el virus y el huésped se altera, la infección latente por VEB se podría asociar con enfermedades crónicas. (Plata, Oviedo, & Rincon-Orozco, 2018)

Fue reportado por primera vez en 1964 por M.A. Epstein, Y.M. Barr y B.G. Achong por microscopia electrónica, quienes descubrieron partículas virulentas en células de tejido de una neoplasia linfática, durante 1970 fue detectado en sueros de pacientes con carcinoma nasofaríngeo. (Torres Espindola, Arellano Galindo, Velazquez Cruz , & Castillejos López, 2013)

### **2.2.3.1 Genoma**

El virion maduro tiene un diámetro aproximado de 120 a 150 nm, su genoma consiste en una doble cadena de ADN linear, dsDNA. El material genético estará envuelto en un core formado por la nucleocapside icosaedrica de 162 capsomeros la cual es contiguo a una porción de tegumento proteico, la envoltura viral está caracterizada por espículas de glicoproteínas importantes para el reconocimiento de receptores y la entrada a la célula hospedadora.

Su material genético contiene aproximadamente 192 kb que codifican al alrededor de 100 genes, organizados en 85 ORF's, tiene un alto porcentaje de G-C, contiene una serie de secuencias repetitivas directas terminales (TR) que flanquean al genoma, las secuencias repetitivas terminales son las responsables

de originar el episoma que es la estructura que el virus adopta en el núcleo de las células infectadas de forma latente. (Plata, Oviedo, & Rincon-Orozco, 2018)

### **2.2.3.2 Características Especiales**

Ambos tipos celulares experimentan un ciclo de replicación lítica, que da como resultado partículas infecciosas en células epiteliales, a nivel de nasofaringe donde se presenta la infección primaria a partir de este punto el virus puede colonizar glándulas salivales, tejidos linfoides y células epiteliales de la orofaringe, una vez ahí puede haber una replicación lítica o dar una expresión de genes latentes caracterizada por: Persistencia del virus, restricción de la expresión viral con alteración del crecimiento celular y proliferación, retención del potencial para la reactivación y reproducción del ciclo lítico. Logra la persistencia intracelular del genoma viral completo (Plata, Oviedo, & Rincon-Orozco, 2018)

### **2.2.3.3 Factores de virulencia**

VEB utiliza diferentes combinaciones de glicoproteínas para definir el tropismo celular e ingresar a la célula blanco (linfocitos B Naive y células epiteliales), una vez que el virus ha ingresado a la célula, durante la descapsidación el ADN viral es transportado, las proteínas virales del tegumento son liberadas al citoplasma.

Dependiendo de la fase en la que se presenta la infección pueden presentarse distintos productos génicos, en la fase lítica se presentan productos génicos inmediatos que serán los responsables del cambio entre la fase de latencia y la lítica: BZLF1, BRFF1, ambas inducen alteraciones morfológicas y funcionales en la mitocondria, obteniendo ATP para ensamblaje; Tempranos participan en la generación de enzimas de la replicación viral: BHRF1; Tardíos: codifican para proteínas de ensamblaje maduración y liberación del virus, importante para evasión del sistema inmune: BCRF1

Durante la fase latencia el genoma dentro del núcleo en forma episomal, ocurriendo una regulación negativa de la expresión génica viral, desencadenando un ciclo de latencia asociadas a distintas patologías

Además de los productos genes, VEB cuenta con:

- Antígenos Nucleares como: EBNA 1 Fosfoproteína de unión específica al ADN, permitiendo que el genoma se mantenga como episoma, incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno; EBNA 2: Regula la expresión de las proteínas de latencia de membrana LMP-1 y LMP-2 y EBNA 3: Regula la expresión de genes celulares.
- Antígenos de membrana: LMP 1: Mimetiza función TNF-  $\gamma$ , CD40. Evita apoptosis por diferentes mecanismos; LMP 2: Mimetiza función BCR, Activa proteínas de unión a célula B, Promueve supervivencia de Linfocitos B induciendo genes antiapoptóticos
- Productos Génicos No Codificados: Se trata de pequeños ARNs no poliadenilados de 167 y 172 nucleótidos, altamente expresados en las células en latencia, asociadas con el crecimiento y proliferación celular.

Los mecanismos patogénicos del VEB son básicamente cuatro:

1. El mantenimiento de las poblaciones celulares infectadas mediante la inhibición de la muerte celular por apoptosis: GENES BHRF 1 y LMP-1
2. La inducción de proliferación celular mediante: GENES LMP-1, EBNA-2, BCRF 1, EBNA-LP
3. La inducción de recombinasas que posibilitan translocaciones mediante: GENES LMP-1, EBNA-2, BCRF 1, EBNA-LP
4. La evasión de la respuesta inmune mediada por células T: GENES BCRF1, mutantes deletionados de LMP-1

(Plata, Oviedo, & Rincon-Orozco, 2018), (Lorenzetti, y otros, 2011), (Toussiroit & Roudier, 2008)

#### **2.2.3.4 Respuesta inmune desencadenada por VEB**

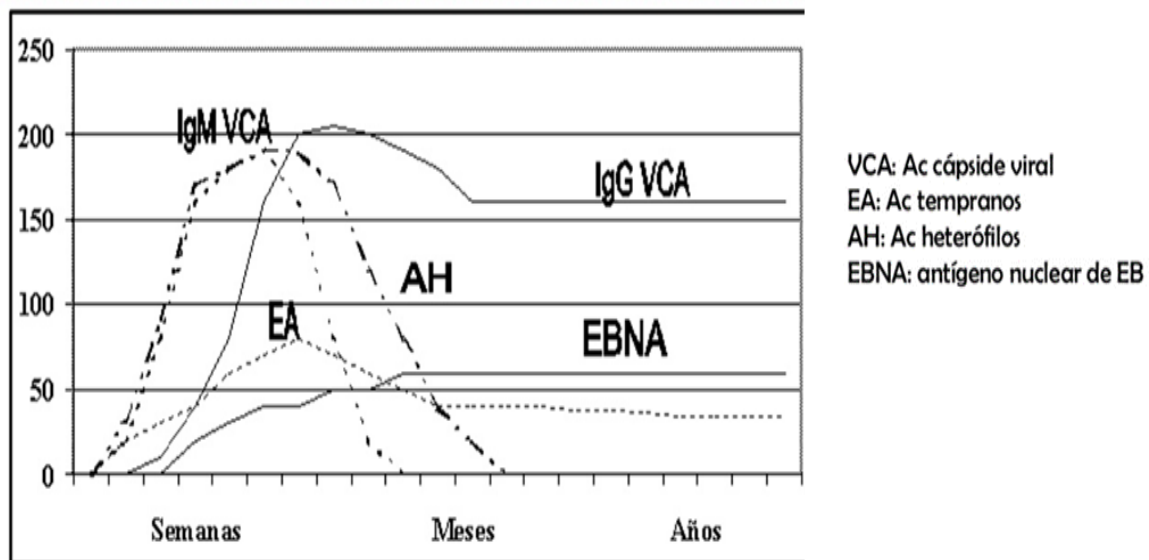
La primoinfección por el virus de Epstein-Barr desencadena una respuesta inmune que es responsable en gran medida de la sintomatología, inicialmente los virus provocan una potente respuesta de interferones tipo I y la intervención de receptores tipo Toll tales como TLR2, TLR3, TLR7 y TLR9. Dentro de las citoquinas proinflamatorias detectadas en suero de pacientes con Mononucleosis infecciosa destaca el INF- $\gamma$ , IL-2, IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . La respuesta adaptativa juega un rol fundamental tanto en el control de la infección como en la presentación de los síntomas, los linfocitos atípicos o células de Donen, son linfocitos T citotóxicos activados que responden a la infección por EBV, caracterizados por poseer un mayor tamaño que los linfocitos maduros y por tener un citoplasma vacuolado basófilo, aunque su hallazgo no es patognomónico. (Plata, Oviedo, & Rincon-Orozco, 2018).

El virus induce el desarrollo de anticuerpos específicos de importancia para el diagnóstico, se pueden realizar pruebas serológicas que demuestran la presencia de anticuerpos heterofilos.

LA IgM dirigida contra los antígenos de la capsida viral (IgM VCA) se detecta en los pacientes hacia el 7mo día de la aparición de los síntomas con un pico entre las 4-5 semanas y persisten por algunos meses. La IgG contra los antígenos de la capsida viral (IgG VCA) tiene un pico ente el 2 y 4to mes, persistiendo de por vida.

Los anticuerpos dirigidos contra EBNA-1 se genera hasta 3 meses después del contacto viral siendo persistente de por vida. Como se muestra en la siguiente ilustración. (Mendoza Montero & Rojas González)

**Ilustración 1 Dinámica de la aparición de títulos de anticuerpos y marcadores moleculares para ser detectado por serología o técnica de PCR.**



Fuente (Mendoza Montero & Rojas González)

### 2.3 Relación entre microorganismos y articulaciones

La asociación entre las infecciones y la inflamación articular es compleja, el diagnóstico es difícil de determinar a pesar del cuadro clínico que sugiere un proceso infeccioso, esta relación fue analizada por el consejo Artritis y Reumatismo, el consenso clasificó la relación entre infección y el compromiso articular en 4 categorías:

- Grupo 1 **Artritis Infecciosa O Artritis Séptica:** se refiere a la presencia de infección en algún lugar del organismo e identificación del antígeno infeccioso o producto microbiano en la articulación.
- Grupo 2 **Artritis Post Infecciosa:** caracterizada por la presencia de infección e identificación del producto bacteriano o antígeno en la articulación.
- Grupo 3 **Artritis Reactiva,** proceso articular inflamatorio en el que la infección se conocía, en tracto urinario y tracto digestivo, en el cual NO se detectaba ningún producto del agente infeccioso o antígeno en la articulación.

- Grupo 4 **Síndrome Articular Inflamatorio** en el cual ni el agente infeccioso ni sus productos o antígenos se detectaban o identificaban en la articulación.

El desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular, genéticas e inmunológicas ha permitido la identificación de los agentes infecciosos causales así como de sus antígenos, por lo que la información respecto a la relación existente entre infección y enfermedades reumáticas debe ser constantemente actualizada

Los microbiólogos han usado formas más rápidas y eficientes para detectar y caracterizar microorganismos, con requerimientos nutricionales especiales o no cultivables, se sugiere:

- 1-Detección de los microorganismos sin amplificación del ácido nucleico, utilizan amplificación de una señal generada por luz o color que resulta de la hibridación de ácido nucleico con molécula diana de ADN.
- 2- Detección, caracterización y la cuantificación de microorganismos usando uno o varios métodos de amplificación de ácidos nucleicos
- 3.- Métodos moleculares para el parentesco de microorganismo (tipificación de especies)

Todas utilizando química de los ácido nucleicos, ahora existen múltiples métodos de amplificación de ADN, la denominación de Reacción de cadena de polimerasa (PCR) aplica como precursora de las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos. (Espinoza & García-Valladares, 2013)

### **3. ANTECEDENTES**

El interés de asociar a los microorganismos con las enfermedades reumáticas ha hecho que múltiples grupos de investigadores realicen estudios internacionales y nacionales acerca este tema

Durante el año 2000 Johnson y cols. Estudiaron la relación de *Mycoplasma fermentans* asociado con diferentes artritis, durante su estudio analizaron el líquido sinovial de 26 pacientes con AR de los cuales todos cumplieron con los criterios diagnósticos de la Asociación Americana de Reumatología, 10 de Osteoartrosis y 8 de artritis inflamatorias con un número total de 34 muestras. Se analizaron los datos del paciente como la edad, género, duración de la enfermedad, actividad de la enfermedad, tratamiento con antiinflamatorios. Se realizó una PCR anidada primero para la detección del gen 16S rRNA para *mycoplasma* spp y posterior para género, se realizó secuenciación del genoma, Durante este estudio se encontró a *M. fermentans* en 31 de 34 muestras, la presencia del microorganismo se restringió a las articulaciones de pacientes con artritis inflamatorias y no se detectó en ningún paciente con OA, pudo asociarse a *M fermentans* con células B, encontrarse al microorganismo en casi todos los pacientes con artritis inflamatoria, los pacientes con AR tienen más ARNm en su líquido sinovial a comparación de otro tipo de artritis. (Johnson, Sidebottom, Bruckner, & Collins, 2000)

En el año 2000 se realizaron la detección de ADN de diversos virus en tejido y líquido sinovial de pacientes con artritis en una etapa temprana, su objetivo era determinar si el ADN Viral se podía detectar en las primeras etapas de las artritis idiopáticas. La presencia de ADN viral se investigó mediante análisis de reacción en cadena de la polimerasa. En los resultados se observó la presencia de VEB, CMV y otros, mostrando que puede detectarse en las muestras sinoviales de pacientes con artritis temprana, independientemente del diagnóstico clínico. Esta observación podría explicarse por la migración de células inflamatorias que albergan ADN viral en las articulaciones inflamadas. (Stahl, y otros, 2000)

2002 Rivera y cols, estudiaron la asociación de *M fermentans* y AR, el microorganismo fue detectado en articulaciones y sangre, sin embargo no era clara la habilidad del microorganismo de entrar al microorganismo y diseminarse hacia la articulación, el propósito fue determinar la habilidad para inducir artritis experimentalmente en conejos con la inoculación e la bacteria a nivel en articular y endotraqueal, se utilizaron 49 conejos, 28 conejos fueron inyectados en la

rodilla derecha 14/14 con distintas cepas , la rodilla izquierda no recibió tratamiento fue considerado el control, hubo un aumento en el diámetro de la articulación como indicador de inflamación articular , 14 conejos fueron inyectados vía traqueal, se realizó una prueba de PCR para confirmar la presencia de *M. fermentans* de las muestras de tejidos sinoviales, pudo observarse que *M. fermentans* fue capaz de inducir artritis cuando fue inoculado por vía intrarticular e intratraqueal, el microorganismo detectado por cultivo, PCR obtenido a partir de sangre, cerebro, corazón, bazo, riñón y ambas articulaciones. A pesar de que *M. fermentans* tienen capacidad de inducir artritis en un modelo animal es fue considerado como una especulación que migre hacia la articulación y sea causa del desarrollo de la artritis. (Rivera, y otros, 2002)

En el 2003 Rivera continuó el estudio aplicado al diagnóstico molecular de *M. fermentans*, por considerarlos como un microorganismo inductor de artritis aguda y crónica a través de mecanismos autoinmunes en el hospedero, se efectuó el aislamiento de micoplasmas a partir del líquido sinovial, debido a la dificultad para cultivarlos en medios libres se han aplicado herramientas de biología molecular, se mostró *M. fermentans* en 23 de 26 pacientes con AR, en 7 de 8 con artritis inflamatoria y 2 en EA, mostraron también distintas cepas, el uso de técnicas biomoleculares está respaldado porque algunos microorganismos incluyendo a los micoplasmas puede incitar la artritis por medio de una infección crónica con una cantidad mínima pero persistente del microorganismo de forma alternativa por el mecanismo denominado "Hit and Run " donde el agente infeccioso se establece en la articulación por un corto tiempo desapareciendo, dejando activa una cascada de eventos proinflamatorios, además de la articulación los micoplasmas puede persistir en otros sitios anatómicos como el tracto genitourinario o respiratorio pudiendo diseminarse nuevamente a articulaciones exacerbando la artritis. (Rivera Tapia, Diagnóstico molecular de *Mycoplasma fermentans* en pacientes con artritis , 2003)

Durante el 2005 Rivera y Cedillo consideraron el rol de la localización intracelular es un factor importante en la artritis reactiva en el caso de VEB que evade el sistema inmune así como *C. trachomatis* y *M. fermentans*, los autores

consideraron que la idea de una cavidad sinovial como sitio estéril ha sido modificada, ya que se ha considerado como un sitio accesible para bacteriemia o por su transporte a células linfoides o monocitos, ya sea como microorganismos viables o como restos bacterianos alcanzan el tejido sinovial pudiendo resolverse de la siguiente forma los microorganismo intrarticulares pueden comportarse de distinta forma: puede ser eliminados, pueden desencadenar una respuesta inflamatoria aguda, una enfermedad sinovial lenta dependiendo de las características del hospedero que involucran un microambiente sinovial, pueden persistir como microorganismos viables en un hospedero tolerante, resultado del mimetismo molecular y si hay presencia de estimulación excesiva dispara la inflamación del tejido sinovial.

El objetivo de su trabajo fue exponer el papel que tienen distintos microorganismos en la artritis reactiva, con técnicas de biología molecular permitieron detectar cantidades de ADN de *C. trachomatis* en cavidades articulares, quiso analizarse la viabilidad en la articulación o la presencia de restos bacterianos transportados a la articulación por medio de macrófagos, efectuaron una técnica de RT-PCR para detectar la presencia del ARNr, los datos sugirieron que el microorganismo puede sobrevivir en pequeñas cantidades en la cavidad articular de paciente con trastornos articulares. Se describió la presencia de *C. trachomatis* y *C. pneumoniae* en 30-15 % de los casos de poliartritis mostrándose proporciones idénticas para *M. pneumoniae* y *M. fermentans*. Los micoplasmas han mostrado amplia variedad de efectos sobre células del sistema inmune ya que actúan como mitógenos inespecíficos de células B y T, debido a la capacidad de inducir fenómenos autoinmunes. (Rivera Tapia & Cedillo Ramirez, Artritis reactiva y microorganismos, 2005)

Aunque la etiología de la AR sigue siendo desconocida, Sawada & Takei en el año 2005 investigaron los componentes genéticos y ambientales de esta enfermedad, tomando al virus de Epstein Barr como probable agente causal de la AR, durante su trabajo trataron de evidenciar la presencia de VEB en células sinoviales inflamadas en pacientes con AR, la señalización asociada a la molécula de activación linfocítica, que es útil para comprender la función deteriorada de las

células T citotóxicas, supusieron la teoría del epítpe que está basada en la asociación de la AR con la relación HLA-DR B que contiene la secuencia de aminoácidos QKRAA, que se ha reportado en VEB. Además identificaron el aumento de anticuerpos de VEB pacientes con AR. El DNA del virus fue detectado y confirmado en el tejido sinovial en pacientes con AR por medio de PCR. Los genes del virus y las proteínas latentes de la membrana fueron demostrados y confirmados por métodos de hibridación e inmunohistoquímica. (Sawada & Takei, 2005)

En el 2011 Luis R. Espinoza y col investigaron la asociación entre las infecciones y la inflamación articular de diferentes microorganismos, la epidemiología de la artritis reactiva es difícil de determinar por la falta de criterios diagnósticos, por la dificultad en la identificación de los microorganismos causantes, la variabilidad genética del HLA B27 y la presencia de factores ambientales que desempeña un papel importante en el origen multifactorial de esta enfermedad, los factores ambientales representados por los agentes infecciosos como *C. trachomatis* que se presenta en el 62 % de los casos, este microorganismo fue identificado serológicamente y cultivado ocasionalmente en pacientes con EA, se informó que los hallazgos fueron corroborados por PCR tanto de sangre periférica como en membrana sinovial, mostraron que la Chlamydia metabólicamente activa es diferente en la expresión genética a la que se encuentra en estado de latencia, mostrando la importancia de las proteína Hsp en este estadio. La mayoría de pacientes afectados son tratados con AINES, aunque se evidencio que el manejo y uso benéfico de antibiótico puede inducir remisión completa y hasta curación en una artritis reactiva inducida por Chlamydia. (Espinoza & García-Valladares, 2013)

En al año 2017 Nathalie Balandrauda & Jean Roudiera en Francia , realizaron un estudio donde demostraron la presencia de anti cuerpos de virus de EBV, considerando a este como factor para el desarrollo de artritis reumatoide (AR), los sueros de pacientes con AR contenían títulos elevados de anticuerpos

contra un antígeno nuclear presente en células infectadas con EBV. Más tarde confirmaron que los sueros de pacientes con AR tenían un alto título de anticuerpos contra antígenos EBV latentes y replicativos como el antígeno nuclear de Epstein-Barr (EBNA), el antígeno de la cápside viral (VCA) y el antígeno temprano (EA). Realizaron técnicas de PCR semicuantitativa para amplificar el VEB en líquido sinovial y saliva de los pacientes con AR, obteniendo un mayor número de positivos que en los controles y pacientes con otras artritis, además de un análisis de cuantificación de ADN de EBV con PCR en tiempo real. Concluyendo VEB es un factor etiológico común en enfermedades reumáticas, siendo una relación compleja que envuelve distintos mecanismos de proteínas y antígenos. (Balandraud & Roudier, 2004)

En 2017 en el Centro investigaciones Microbiología BUAP, Zenteno D estudio el papel de la apolipoproteína E y los micoplasmas en las enfermedades reumáticas, se analizaron 74 muestras clínicas de 65 pacientes con padecimientos reumáticos buscando micoplasmas por medio de cultivo microbiológico y PCR además de la detección de ApoE por medio qPCR, de las muestras estudiadas 37 fueron positivas para micoplasma donde se identificaron distintas especies de las cuales *M fermentans* fue el más frecuente 8 /37, seguido de *M penetrans* 4/37 y *M genitalium* 2/37, 20 no pudieron ser caracterizadas dentro de las especies estudiadas, a pesar de encontrar altos índices de la especies micoplasmas no se observó una asociación estadística representativa. (Zenteno, 2017)

Durante 2019 en Centro Detección Biomolecular BUAP , se realiza estudio de detección VEB y *Chlamydia trachomatis*, se analizaron 46 muestras de líquido sinovial y 16 muestras de sangre de pacientes de distintas enfermedades reumáticas, a todas las muestras se les realizo PCR punto final, de las 46 muestras de líquido sinovial 16 resultaron positivas 8 de AR , 2 OA y 6 de enfermedad reumática no determinada, de las 16 muestras de sangre solo 3 resultaron positivas, ninguna muestra dio positivo para chlamydia trachomatis al igual que los voluntarios, obtuvieron un resultado menor al comparado con otro estudio, aunque la presencia del VEB no fue alta si pudo detectarse la presencia del microorganismo lo que fue útil para confirmar una relación con la enfermedad

como la artritis reumatoide, a pesar de la ausencia de *C. trachomatis* no se descarta la idea de que juegue un papel importante en la etiología de la enfermedades reumáticas. (Nuñez, 2019)

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

El incremento de la prevalencia de las enfermedades reumáticas y la importancia de sus graves consecuencias económicas como el empobrecimiento, altos costos en la atención médica, las incapacidades laborales y sociales así como el deterioro en la calidad de vida, llena de relevancia el estudio de estas patologías, es de conocimiento el origen multifactorial de estas enfermedades, y aunque es desconocido el factor detonador cada vez es más importante el rol que juegan los microorganismos como agentes causales únicos o como coinfección.

Existe reportes de la asociación de los microorganismos en estudio y las enfermedades reumáticas, por lo que este trabajo busca establecerse como una base para continuar estudios respecto al papel que desempeñan los microorganismos, buscando establecer un tamizaje en este tipo de enfermedades por métodos microbiológicos y moleculares al fin de facilitar el diagnóstico que junto con una historia clínica adecuada, antecedentes epidemiológicos sea administrado un tratamiento oportuno y adecuado al agente causal, evitando así las secuelas que provocan este tipo de enfermedades.

#### **5. HIPOTESIS**

¿Existe alguna relación entre las enfermedades reumáticas y microorganismos?

¿Los microorganismos en estudio se presentan como factores detonadores de una enfermedad aguda, crónica o exacerbación de enfermedades reumáticas?

Se intenta asociar la causalidad de *Mycoplasma* y Virus de Epstein Barr en enfermedades reumáticas, la técnicas biomoleculares ayuda en la detección de microorganismos intracelulares a partir de muestras de sangre y liquido sinovial de pacientes con múltiples enfermedades reumáticas.

## **6. Objetivos**

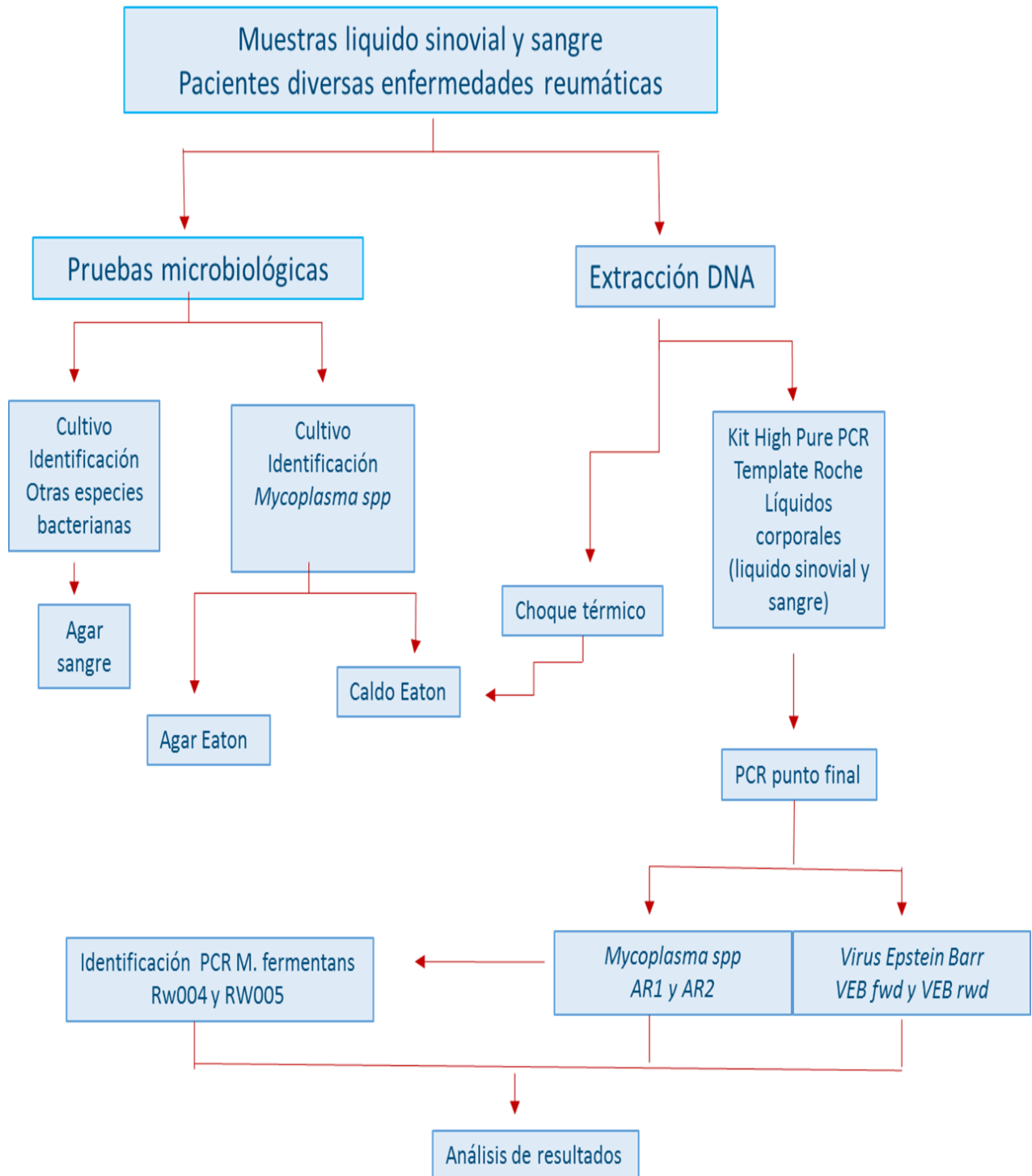
### **6.1 Objetivo general**

Determinar la frecuencia con la que se encuentra a *Mycoplasma spp.* y Virus de Epstein Barr en líquidos corporales de pacientes con diversas enfermedades reumáticas.

### **6.2 Objetivos particulares**

- 1.- Detectar presencia *Mycoplasmas spp* por Medio de cultivo (Eaton).
- 2.- Detectar presencia *Mycoplasmas spp* por PCR punto final en líquidos corporales (sangre y líquido sinovial).
- 3.- Detectar presencia *Mycoplasma spp* por PCR punto final de muestra medio de cultivo realizado.
- 4.- Identificar *M. fermentans* en muestras positivas a *Mycoplasma spp* por PCR y medio de cultivo.
- 5.- Detectar presencia Virus de Epstein Barr por PCR punto final en líquidos corporales (sangre y líquido sinovial).

## 7. ESTRATEGIA METODOLÓGICA



## **8. DISEÑO EXPERIMENTAL**

Se trata estudio no experimental, transversal, correlacional, prospectivo

### **8.1 Criterios de Inclusión**

- Pacientes con enfermedades reumáticas.
- Que cumplan con los criterios diagnósticos de la Asociación Americana de Reumatología.

#### **8.1.1 Grupo de estudio**

Todos los pacientes que acudan a consulta al Servicio de Reumatología del Centro Médico Manuel Ávila Camacho de Enero de 2019 a Febrero de 2020.

### **8.2 Criterios de Exclusión**

- Pacientes que no cumplan con los criterios diagnósticos
- Pacientes que cursen con alguna enfermedad infecciosa al momento de la toma de la muestra.
- Pacientes que estén tomando algún antibiótico con mecanismo de acción diferente al de destruir pared celular.

### **8.3 Criterios Eliminación**

Pacientes que no desearon participar en el estudio.

### **8.4 Consideraciones Éticas**

Todos los pacientes que accedieron voluntariamente a formar parte del estudio que haya firmado la carta de Consentimiento Informado (Anexo 1). Se da privacidad a los datos del paciente.

## **9. MATERIALES Y METODOS**

### **9.1 Sujetos de Estudio**

Fueron estudiados 35 pacientes que acudieron a consulta de Reumatología en el Centro Médico Manuel Ávila Camacho de Puebla, México. Los pacientes fueron

valorados y diagnosticados por el Dr. David Bañuelos Ramírez, Médico Reumatólogo, cumpliendo con los criterios de inclusión y de exclusión pertenecientes a este estudio.

## 9.2 Especímenes

Se recolectaron 41 muestras de líquidos corporales de las cuales 39 fueron de líquido Sinovial y 2 de sangre venosa.

## 9.3 Recolección de muestras

Las muestras fueron recolectadas por el Dr. David Bañuelos con una adecuada técnica aséptica y antiséptica de la región, el líquido sinovial en jeringas estériles y en tubos EDTA la sangre venosa. Se realizó el traslado a temperatura ambiente sin exposición a cambios bruscos de temperatura al laboratorio de micoplasmas del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas y al Centro de Detección Biomolecular.

Al llegar la muestra al laboratorio se coloca bajo técnica estéril en tubos de ensayo para su conservación, se le asignó una letra y número como identificación asignándolos de la siguiente manera

S	Sangre	000 un numero progresivo
L	Líquido Sinovial	
P	Plasma	

Se registraron los datos que fueron enviados como el nombre del paciente, edad, diagnóstico, fecha de recolección y tipo de muestra, (dependerán de los datos proporcionados).

Se resguardo el excedente posterior a la realización de cultivo en ultra congelador REVCO a -70°C.

Las muestras obtenidas se emplearon para la detección de *Mycoplasma spp*, *M. fermentans* y Virus de Epstein Barr por PCR y detección de *Mycoplasma spp* por medio de cultivo.

#### **9.4 Identificación por cultivo de *Mycoplasma* spp**

La identificación se realizó por cultivo tipo Caldo y Agar Eaton las especificaciones de la preparación se muestran en el Anexo 2 , bajo condiciones de esterilidad se colocó 1800 µl de Caldo Eaton en tubos de ensayo, se inocularon con 200 µl de líquidos corporales (sangre / líquido sinovial), se puso un control negativo en un tubo de ensayo con 2000 µl de caldo Eaton, se sellan herméticamente, posteriormente se incubaron a 37 °C en por un periodo de 21 días, se busca observar el vire del indicador (Rojo Fenol) de color rojo a amarillo, sin mostrar turbidez mostrándose como positivos por considerar el crecimiento del microorganismo, los cultivos donde no había cambio de coloración fueron considerados negativos.

Al mismo tiempo para corroborar el crecimiento de microorganismos se realizó una siembra por micro goteo en agar Eaton, por descarga directa y sin estriar se colocaron 20 µl sobre la superficie del Agar, se incubaron a 37 °C por 7 días y se observaron a partir del día de 3 se observaron en el microscopio estereoscópico buscando las microcolonias de aspecto homogéneo características del microorganismo, las cuales presentan una morfología similar a huevo frito y/o forma de mora, con un precipitado central y turbidez en la periferia.

#### **9.5 identificación microbiológica de otras especies bacterianas**

Los muestras recibidas también fueron analizadas en busca de otras especies bacterianas, se realizaron cultivos en agar sangre de cordero al 2 % utilizando 25µl de la muestra clínica, distribuyéndola en estría cruzada, posteriormente se llevaron a incubación a 37 °C por un periodo 48h. En el caso de observar crecimiento bacteriano o reacción de hemólisis se realizarían pruebas bioquímicas convencionales (Criterios Cowan & Steel modificados) de para la identificación de especies bacterianas. (Cabrera Maldonado, y otros, 2001)

#### **9.6 Extracción ADN de muestras clínicas**

Se almacenó 1 ml de muestra clínica para realizar el procedimiento, se empleó el kit comercial High Pure PCR Template de Roche siguiendo las instrucciones proporcionadas por el proveedor, el procedimiento se detalla en el Anexo 3.

Antes del procesamiento de las muestras se realizó centrifugación a 18,000rpm por 45 minutos, descartando parte del sobrenadante, utilizando 300  $\mu$ l del fondo de tubo.

### **9.7 Extracción ADN de Cultivos de Caldo Eaton**

La extracción a partir de los cultivos de caldo Eaton se realizó por medio de la técnica de Choque térmico el procedimiento se detalla en el Anexo 4, se le realizó a todas las muestras clínicas sin importar si hubo vire del indicador, se toma 1 ml de a muestra de caldo Eaton sometiénolo a un aumento y disminución de la temperatura, que permite la concentración del material genético, lisis celular y al terminar la liberación del ADN, se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso posterior.

### **9.8 Cuantificación y determinación de concentración DNA**

Al terminar la extracción las muestras de ADN de ambas técnicas realizadas estas fueron cuantificadas en nanofotómetro (Pearl de Implen) para determinar la concentración y grado de Pureza de ADN. La concentración de la muestra de ADN se calcula teniendo en cuenta el valor de la absorbancia obtenido de la longitud de onda de 260nm, la relación A260/A280 nos indica la pureza de la muestra, se india un pureza aceptable entre 1.6 a 2.0, la relación n solo se realizó a las muestras de líquido sinovial y sangre venosa extraídas por kit.

### **9.9 Determinación por PCR**

La detección del *mycoplasma spp* se llevó a cabo a partir de las muestras clínicas recibidas y los cultivos de caldo Eaton empleando la técnica de PCR punto final, utilizando las extracciones realizadas, para Mycoplasma spp se tomó un fragmento conservado de más de 30 especies del gen 16s ribosomal. Se amplificó un producto de 301 pb aproximadamente. Para la identificación de *M fermentans* se

llevó a cabo a las muestras clínicas que resultaron positivas a la detección de mycoplasma, se amplificó un elemento de inserción de 206pb.

En la tabla N° 2 se detallan las secuencias de oligonucleótidos utilizados, que tipo de producto se amplifica, el tamaño del producto, las temperaturas de alineamiento.

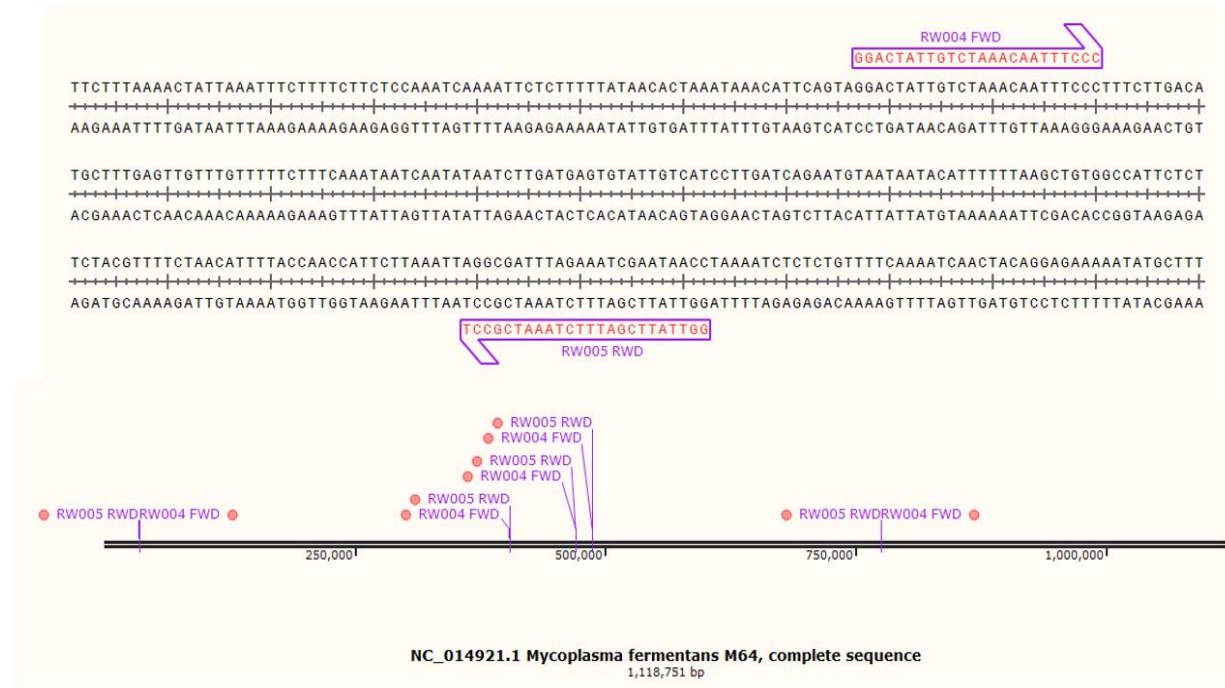
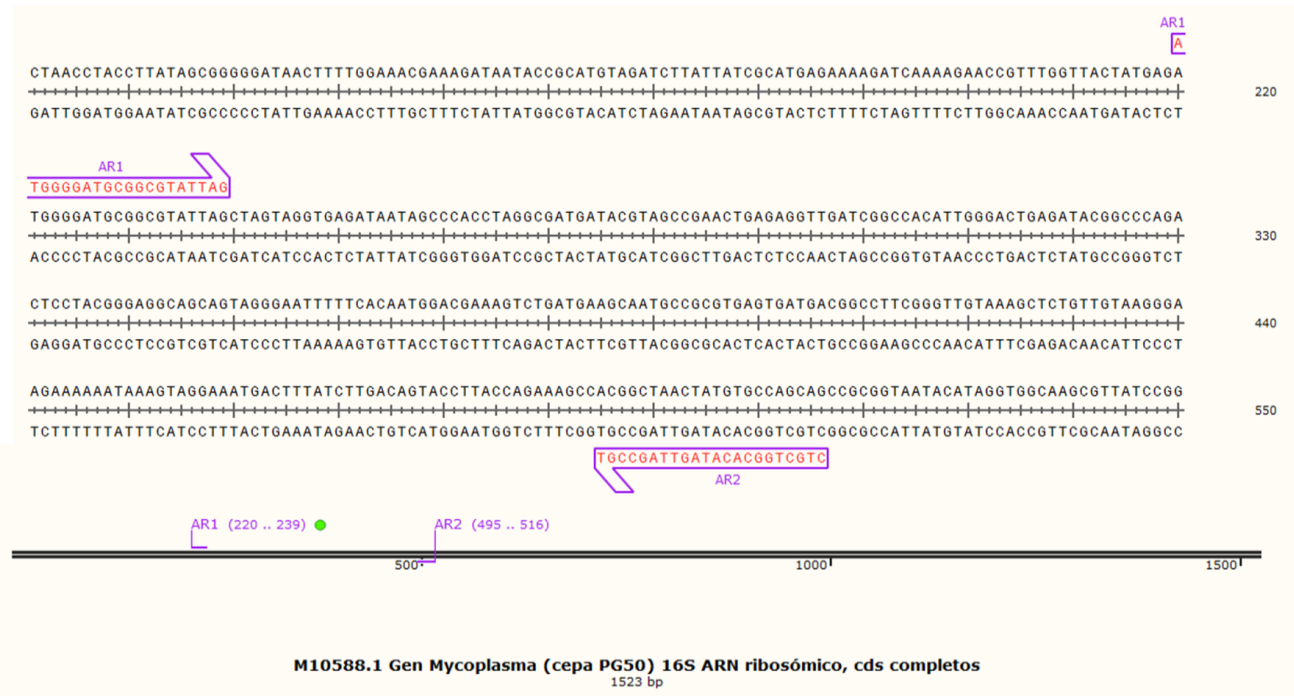
**Tabla 2 Secuencia de iniciadores para *Mycoplasma spp* y *M fermentans***

Espece	Nombre oligonucleótido	Secuencia Oligonucleótido	Tamaño del fragmento	Origen	Tm
<i>Mycoplasma spp</i>	AR1 FWD	5'ATGRGGRTGCGGCGTATTAG3'	301pb	Gen 16S rRNA	60°C
	AR2 RWD	5'CKGCTGGCACATAGTTAGCCRT3'			
<i>Mycoplasma fermentans</i>	RW004 FWD	5'GGACTATTGTCTAAACAATTTCCC3'	206pb	Elemento IS	55°C
	RW005 RWD	5'GGTTATTCGATTCTAAATCGCCT3'			

Fuente: (Sidhu, Rashidbaigi, Testa, & Liao, 1995)

Se realiza un alineamiento de la cepa PG50 (GenBank: M10588.1) con el gen 16s de ARN ribosómico de los oligonucleótidos utilizado para *Mycoplasma spp*, para *M. fermentans* se utilizó *Mycoplasma fermentans* M64, complete séquense (NCBI Reference Sequence: NC\_014921.1) se realiza alineamiento con oligonucleótidos que amplifican elementos IS como se muestra en la siguiente ilustración.

**Ilustración 2 Alineamiento secuencia *Mycoplasma spp* y *M. Fermentans* con oligonucleótidos utilizados.**



Fuente: Secuencias tomadas NCB1 alineamiento realizado por mí en herramienta SNAPGENE

En la Tabla N° 3 se observan el contenido de la reacción y las concentraciones utilizadas para la reacción de amplificación de *Mycoplasma spp* y *M. fermentans* Se calculó para u volumen final de 10 µl.

**Tabla 3 Componentes y concentraciones utilizados para las PCR realizadas para determinación de *Mycoplasma spp* y *M. fermentans***

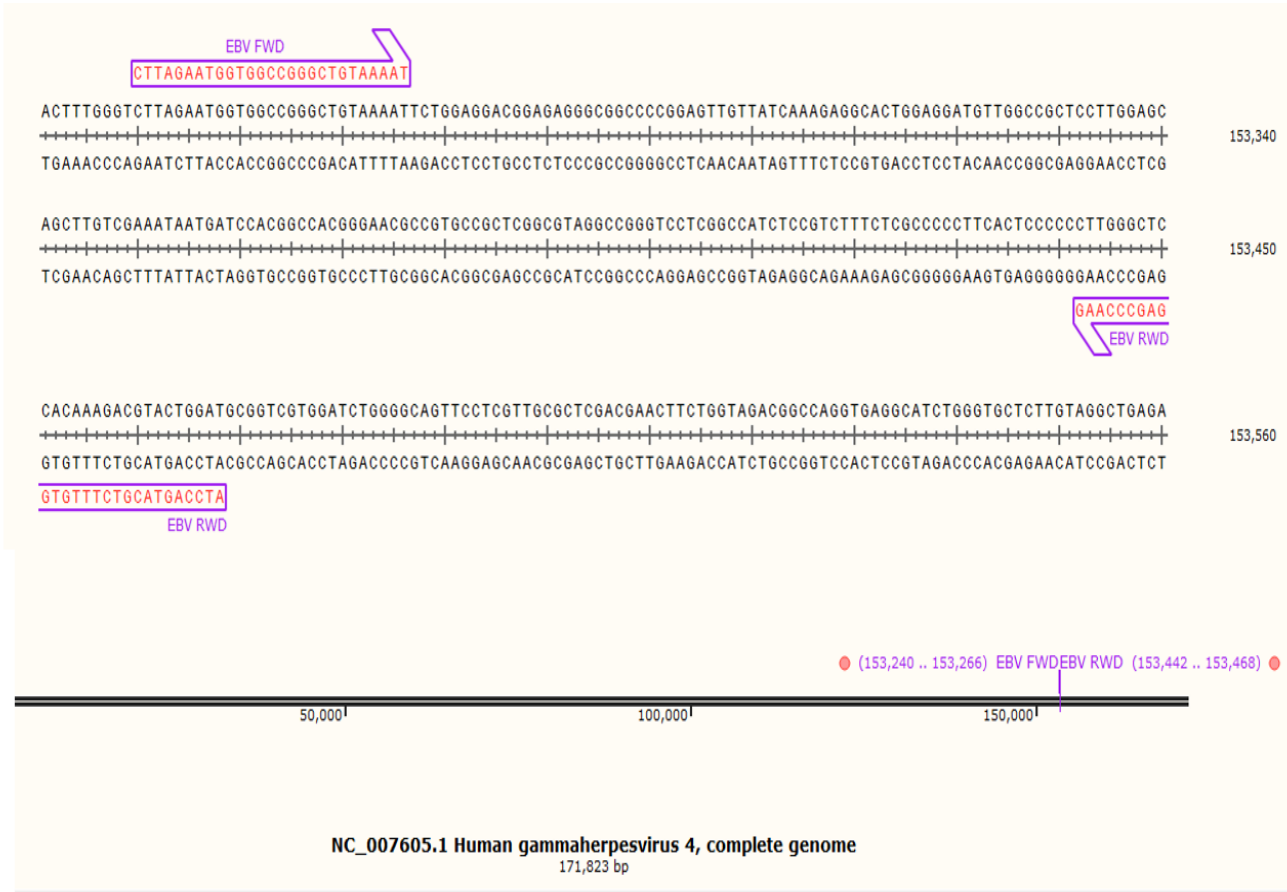
Componentes de la reacción	Volumen por reacción	Concentración del stock	Concentración final en la reacción
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	5.7 µL	-	-
10X DreamTaq DNA polimerasa (Thermo Scientific)	0.1 µL	5 U/ µL	0.5 U
MgCL <sub>2</sub> (Thermo Scientific)	Incluido en el buffer	20mM	2mM
Buffer 10X (Thermo Scientific)	1 µL	10x	1x
dNTPs mix (10mM)	0.2 µL	10mM	0.2mM
Primer Forward (10 µM)	0.5 µL	10 µM	0.5 µM
Primer Reverse (10 µM)	0.5 µL	10 µM	0.5 µM
Templado DNA	2.0 µL	100ng/ µL	20ng
Volumen final	10 µL		

Fuente (Chavarria, 2019)

Las reacciones para *Mycoplasma spp* y *M. fermentans* se amplificaron en el termociclador Techne TC-412 con las siguientes condiciones: 1 ciclo de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 minuto, alineamiento a la T<sub>m</sub> específica para cada oligonucleótido, mencionada en la tabla 2 durante por 1 minuto, una extensión a 72 °C por 1 minuto, con un ciclo de extensión final a 72 °C por 5 minutos.



**Ilustración 4 Alineamiento secuencia de Virus de Epstein Barr con oligonucleótidos utilizados**



Fuente: Secuencias tomadas NCB1 alineamiento realizado por mí en herramienta SNAPGENE

En la Tabla 5 se observan el contenido de la reacción y las concentraciones utilizadas para la reacción de amplificación de Virus de Epstein Barr Se calculó para u volumen final de 25 µl.

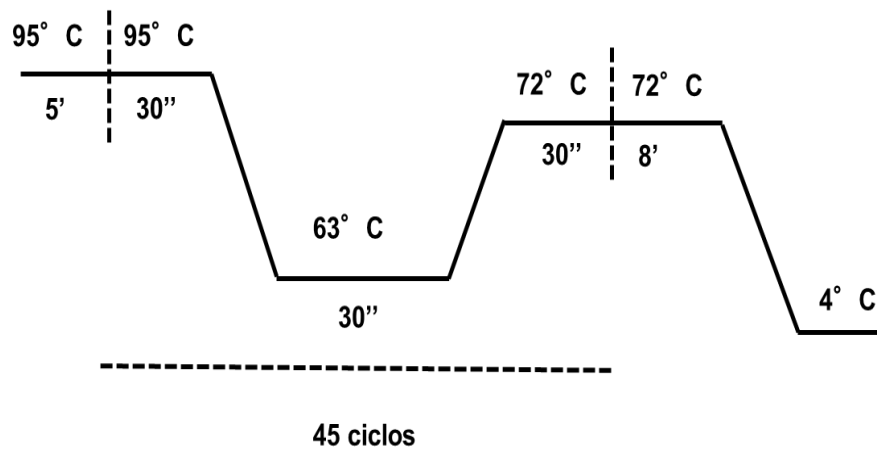
**Tabla 5 Componentes y concentraciones utilizados para las PCR realizadas para determinación de Virus de Epstein Barr**

Componentes de la reacción	Volumen por reacción	Concentración del stock	Concentración final en la reacción
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	13.6 µL	-	-
DreamTaq DNA polimerasa (Thermo Scientific)	2.5 µL	5 U/ µL	12.5 U
MgCL <sub>2</sub> (Thermo Scientific)	Incluido en el buffer	20mM	2mM
Buffer 10X (Thermo Scientific)	2.5 µL	10x	2.5x
dNTPs mix (10mM)	1.25 µL	10mM	1.25 mM
Primer Forward (10 µM)	1.25 µL	10 µM	1.25 µM
Primer Reverse (10 µM)	1.25 µL	10 µM	1.25 µM
Templado DNA	5.0 µL	100ng/ µL	50 Ng
Volumen final	25 µL		

Fuente: (Nuñez, 2019)

La reacción para VEB se llevó acabo en el termociclador Techne TC-412 con las siguientes condiciones:

1 ciclo de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguido de 45 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, alineamiento a 63 °C por 30 segundos, una extensión a 72 °C por 30 segundos y un ciclo de extensión final a 72 °C por 8 minutos.



**Ilustración 5 Condiciones de temperatura y tiempo utilizadas para amplificación de Virus de Epstein Barr**

Se utilizaron los mismos Componentes y concentraciones utilizados para la PCR punto final realizado para determinación de Virus de Epstein Barr, mismos que se mencionan en la tabla 5.

## 10. Resultados

### 10.1 Sujetos de estudios

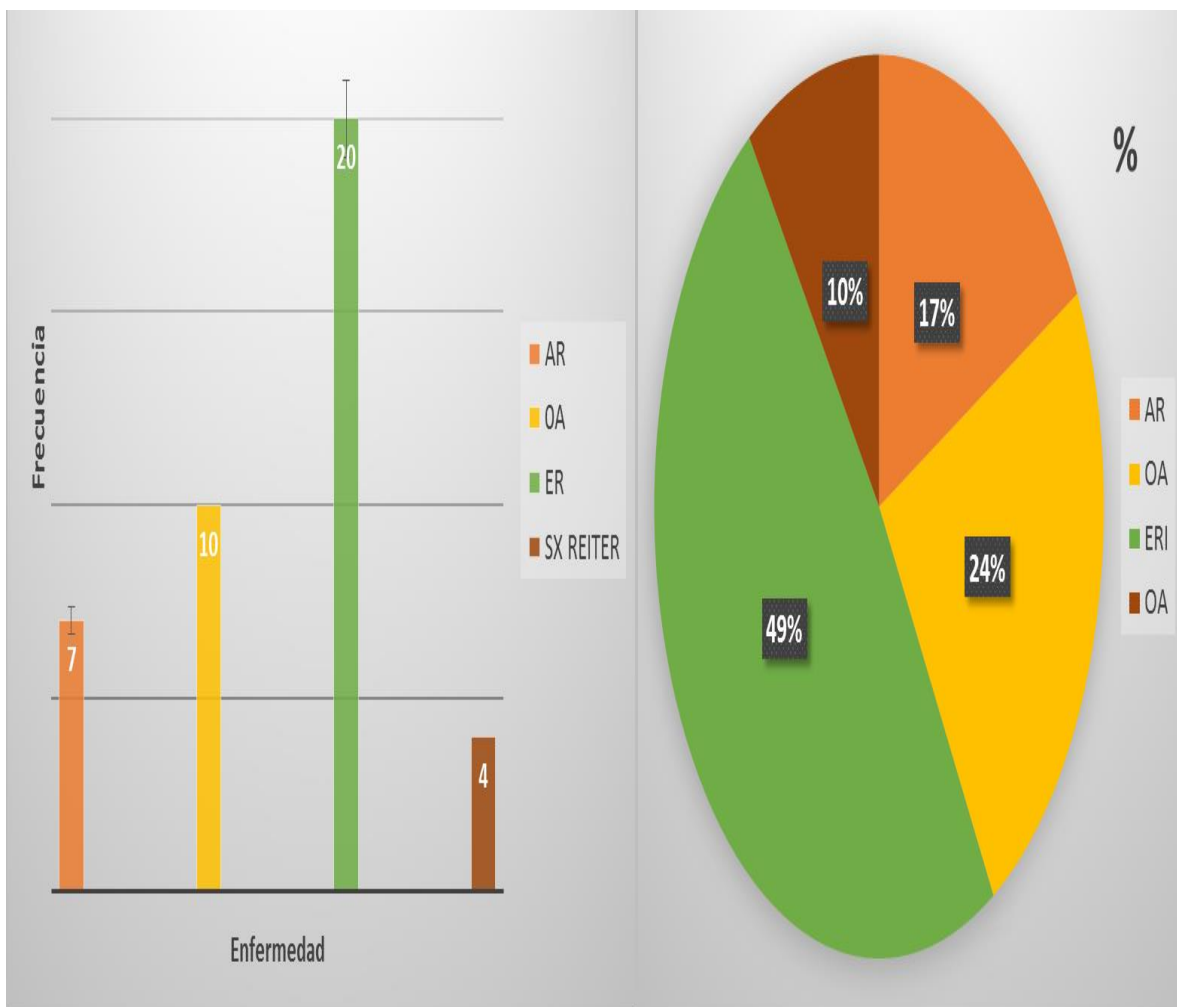
Se recibieron un total de 41 muestras de un total de 35 pacientes del servicio de reumatología del Centro médico Manuel Ávila Camacho en la ciudad de Puebla, Puebla, de pacientes diagnosticados con enfermedades reumáticas durante el periodo de tiempo Enero de 2019 a Febrero de 2020, cumplieron con los criterios de inclusión para el estudio y aceptaron formar parte del estudio firmando el consentimiento informado, de los 35 pacientes el 63% (n = 22) son mujeres y el 37 % (n = 13) son hombres.

No se conoce con exactitud la historia clínica de los pacientes, por lo que se desconoce si la enfermedad es de recién diagnóstico, si se encuentra en un periodo agudo o crónico, ni tampoco la severidad.

De las 41 muestras recibidas el 95.2% (n = 39) fueron líquidos sinoviales y el 4.8% (n = 2) restantes fueron muestras de sangre venosa con EDTA, en

algunos de los pacientes fueron analizadas articulaciones simétricas, dentro de los padecimientos reportados encontramos Artritis reumatoide (AR), Osteoartrosis, Sx Reiter y Enfermedades reumáticas indeterminadas, la cantidad de muestras en relación con las enfermedades se muestra en la Ilustración N° 6, siendo las más frecuentes son las enfermedades reumáticas indeterminadas con 48.7 % ( n=20), seguida de Osteoartrosis con un 24.3 % ( n=10), Artritis reumatoide con 17.2% ( n= 7), y Sx Reiter con 9.8% ( n=4) .

**Ilustración 6 Graficas de la relación del número de muestras recibidas por enfermedad reumática y sus porcentajes**

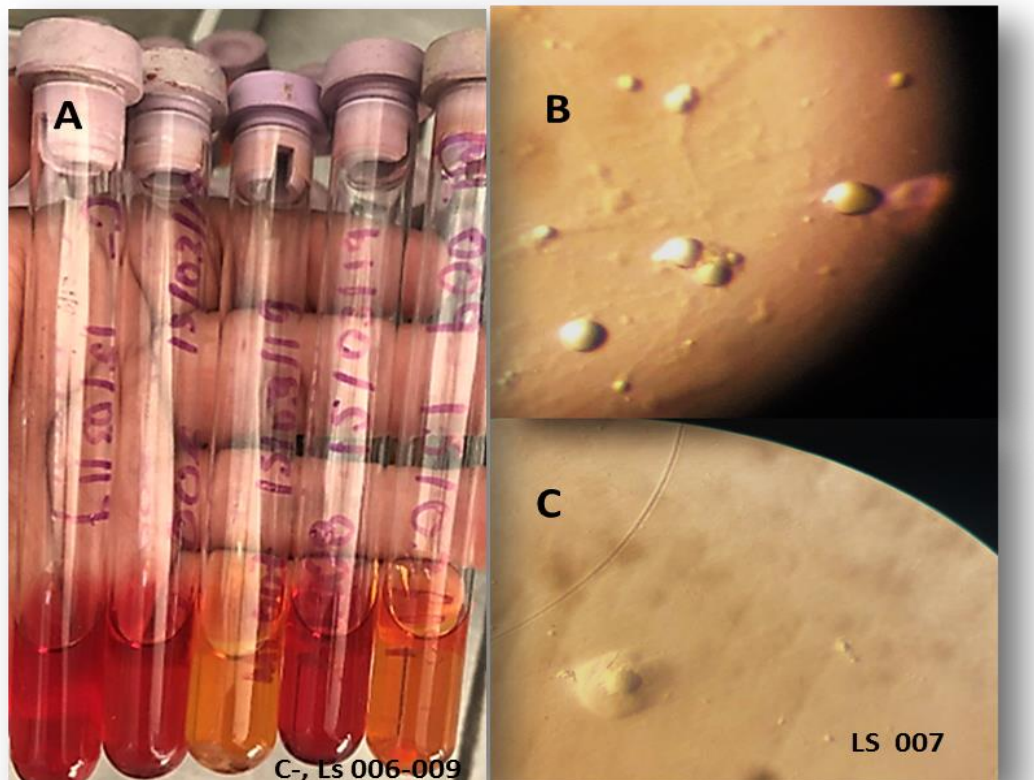


Fuente: Castillo, D (2020)

## 10.2 Detección de *Mycoplasma spp* por medio de cultivo

Las 41 muestras recibidas fueron cultivadas en caldo y agar Eaton, todas las muestras admitidas contaron con el volumen adecuado para realizar los cultivos, en el caso del Caldo Eaton el 17 % (n=7) de las muestras se consideraron como positivas al virar de color rojo o amarillo por el indicador de ph de los cuales 6 fueron de líquido sinovial y 1 de sangre. En cultivo en Agar Eaton el 29.2% (n=12) de las muestras mostraron formación de colonias 11 de ellas fueron muestras de líquido sinovial y 1 de sangre, algunas en forma de mora y otras con la forma característica de huevo frito, como se muestra en la siguiente ilustración

**Ilustración 7 Muestras positivas en caldo y Agar Eaton**

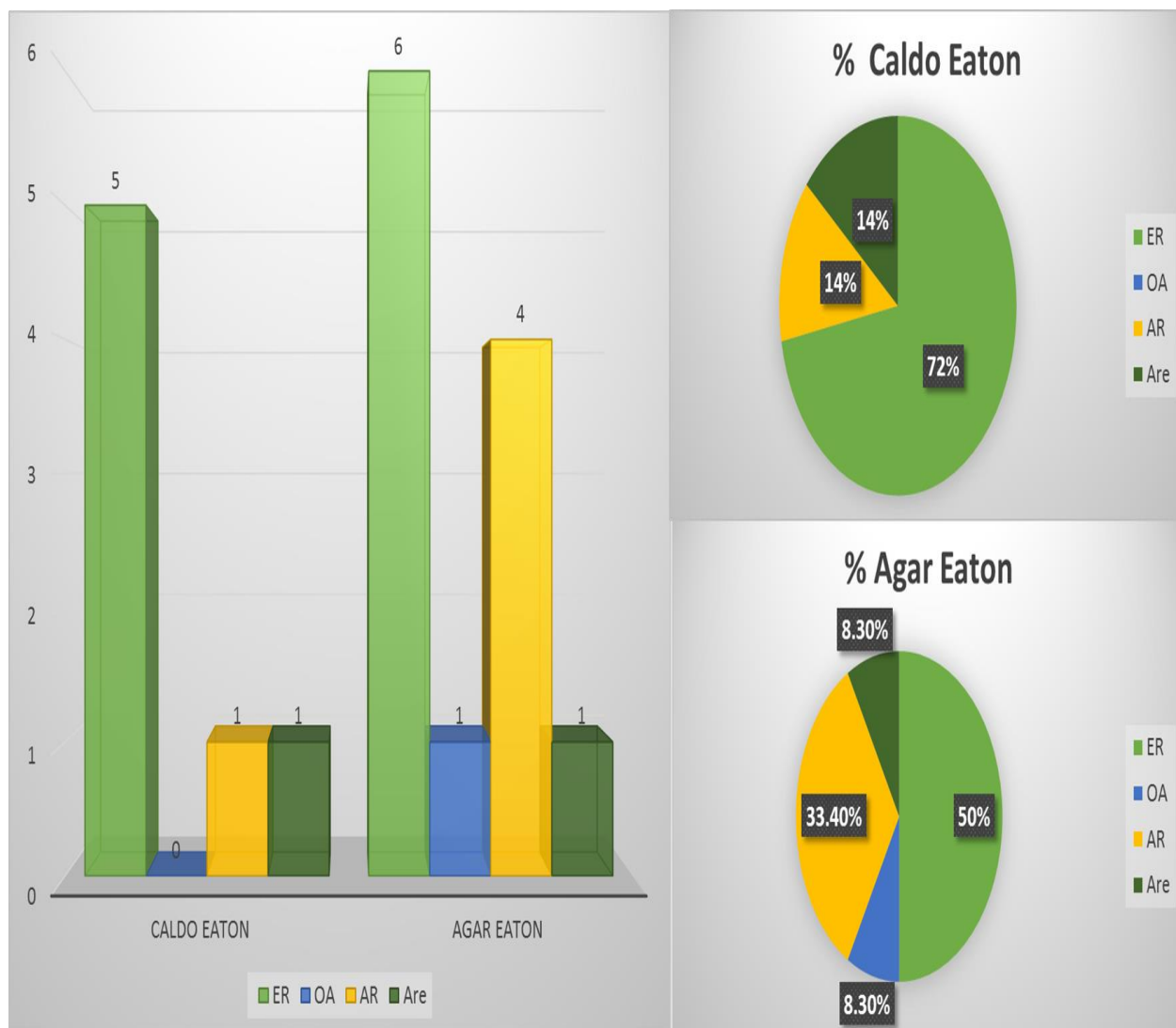


Fuente: Castillo, D (2020)

- Cultivo en Caldo Eaton, se muestra C- ( 1er tubo), Muestras LS 006 a LS 009, considerando el cambio de color rojo a amarillo, sin presencia de turbidez
- Presencia de microcolonias de características fenotípicas de Mycoplasma en forma de mora con bordes redondeados
- Microcolonias con forma característica de Huevo frito.

Las muestras positivas del Caldo y Agar Eaton se relacionaron a enfermedades reumáticas indeterminadas, artritis reumatoide, Osteoartrosis y artritis reactiva (Sx Reiter). En la Ilustración N° 8 se muestra la frecuencia con la que se presentaron las distintas enfermedades reumáticas y los porcentajes que representan.

**Ilustración 8 Graficas de relación Muestras positivas en caldo y Agar Eaton con enfermedad reumática y sus porcentajes**

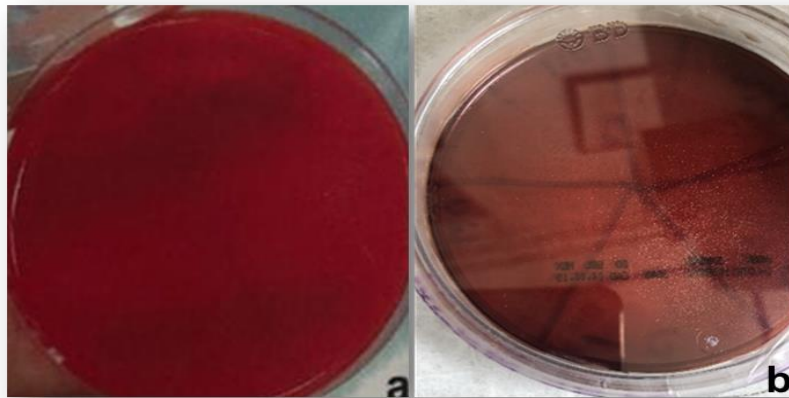


Fuente: Castillo, D 2020

### 10.3 Identificación microbiológica de otras especies bacterianas

A las 41 muestras clínicas recibidas se les realizó la identificación de otras especies bacterianas, se realizó la siembra de estas en Agar Sangre de Carnero al 2 %, en caso de resultar positivo se realizarían pruebas bioquímicas de otras especies como bacterias aerobias facultativas que son frecuentes en la infección de articulaciones y sangre, del 100 % de las muestras analizadas ninguna dio resultado positivo a otro microorganismo.

**Ilustración 9 Identificación otras especies bacterianas en Agar sangre de cordero**



- A) Agar sangre de Cordero recién inoculado con muestras clínicas.
- B) Agar sangre de Cordero a las 48 hrs de inoculación.

### 10.4 Identificación de *Mycoplasma Spp* por PCR punto final.

En la identificación del genero mycoplasma se utilizaron oligonucleótidos para la amplificación del gen 16s rRNA después de la extracción de DNA, Se realizó el procedimiento a 92 muestras de las cuales 37 fueron líquidos sinoviales, 1 sangre, 41 caldo de cultivo Eaton, 13 controles negativos de los Medios de Cultivo de caldo Eaton.

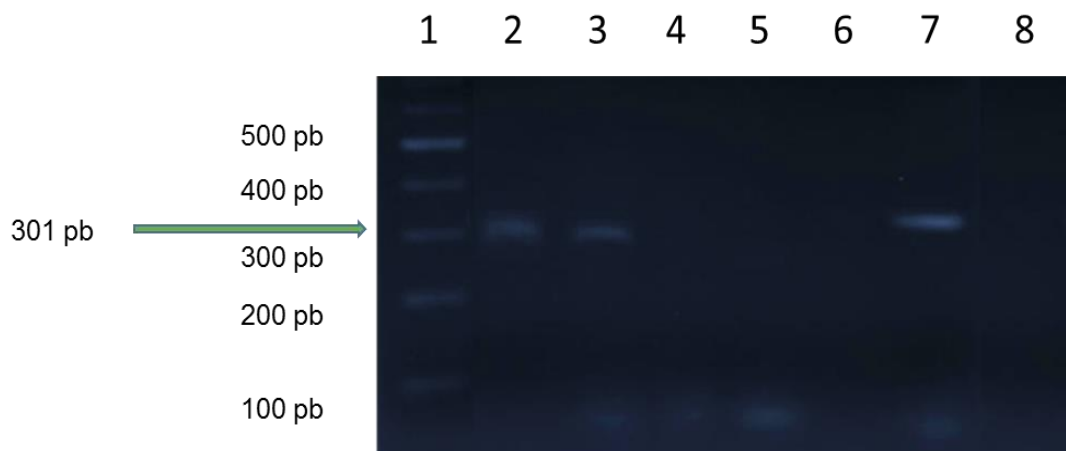
En líquido sinovial se obtuvo un 7.6 % de muestras positivas (n=7) el 8 % (n=8) fueron positivas a las realizadas a partir del medio de Cultivo y el 0.92% (n=1) fue positivo sangre , en los controles negativos del medio no se obtuvo

ningún resultado positivo. Los resultados obtenidos se desglosan en la tabla 6. En la Ilustración 13 se visualiza la electroforesis en gel de agarosa de los productos para PCR.

Tabla 6 Muestras positivas en identificación de *Mycoplasma spp*

Tipo de muestra	Total de muestras	Positivas para <i>Mycoplasma spp</i> por PCR punto final
Líquido sinovial	37	7
Cultivo Caldo Eaton	41	8
Sangre	1	0
Control Negativo Caldo Eaton	13	0
<b>Total</b>	<b>92</b>	<b>16</b>

Ilustración 10 Visualización de productos PCR por corrimiento electroforético en gel de agarosa *Mycoplasma spp*



Visualización de productos PCR por corrimiento electroforético en gel de agarosa  
 Carril 1 mpm carril 2: LS007, carril 3: LS009 Muestras positivas a *Mycoplasma spp*  
 Carriles 4,5,6 muestras negativas a *Mycoplasma spp*  
 Carril 7 Control positivo (fragmento 301pb)

## 10.5 Comparación de medios de cultivo agar y caldo Eaton y detección por PCR para búsqueda de *Mycoplasma Spp*

Se realizó la comparación de casos positivos de los 4 métodos realizados (Cultivo Eaton, Agar Eaton, PCR punto final para muestras y PCR para caldo de cultivo) para la detección de micoplasma, de las 41 muestras 13 resultaron positivas a algún método, el 39 % (n=5) fueron confirmadas por los 4 métodos, el 15% (n=2) fueron positivas a 3, el 23 % (n=3) a 2 y a 1 respectivamente. Como se muestra en la tabla 7 las muestras 002, 007,009, 019 y 041 fueron positivas a los 4 métodos, la muestra 001 solo fue positiva a 3 debido a que no pudo realizarse la PCR de líquido sinovial ya que la muestra fue insuficiente

Tabla 7 Comparación de métodos de identificación *Mycoplasma spp*

MUESTRA	Cultivo Caldo Eaton	Agar Eaton	PCR Liquido sinovial	PCR Caldo Eaton	
LS002	+	+	+	+	4 Metodos +
LS007	+	+	+	+	3 Metodos +
LS009	+	+	+	+	2 Metodos +
LS019	+	+	+	+	1 Metodo +
SS041	+	+	+	+	+ Positivo
LS001	+	+	X	+	- Negativo
LS025	-	+	+	+	X Muestra Insuficiente
LS005	+	+	-	-	
LS013	-	+	+	-	
LS029	-	-	+	+	
LS010	-	+	-	-	
LS014	-	+	-	-	
LS023	-	+	-	-	

El cultivo en Agar Eaton dio más resultados positivos en comparación con las otras técnicas, se decide hacer una nueva amplificación del fragmento 16s

rRNA al producto ya amplificado de las muestras LS005, LS010, LS013, LS014, LS023 LS025 LS029, esto debido a que en ocasiones las colonias no son suficientes para hacer vire en el indicador o para ser detectadas por PCR punto final. Solamente 3 de 7 muestras re amplificadas resultaron positivas, lo que nos da un total de 7 muestras positivas a los 4 métodos realizados, la muestra LS001 también podría considerarse positiva ya que fue positiva a los 3 de 4 métodos pero no se contó con la cantidad suficiente de muestra para realizar la PCR, los resultados se muestran en la Tabla 8. La combinación de los 4 métodos aumenta la sensibilidad y especificidad en la identificación y diagnóstico de *mycoplasma spp*

Tabla 8.. Comparación de métodos de identificación Mycoplasma spp posterior a reamplificación de muestras positivas a Agar Eaton.

MUESTRA	Cultivo Caldo Eaton	Agar Eaton	PCR Liquido sinovial	PCR Caldo Eaton
LS002	+	+	+	+
LS007	+	+	+	+
LS009	+	+	+	+
LS013	+	+	+	+
LS019	+	+	+	+
LS025	+	+	+	+
SSO41	+	+	+	+
LS001	+	+	X	+
LS029	+	-	+	+
LS005	+	+	-	-
LS010	-	+	-	-
LS014	-	+	-	-
LS023	-	+	-	-

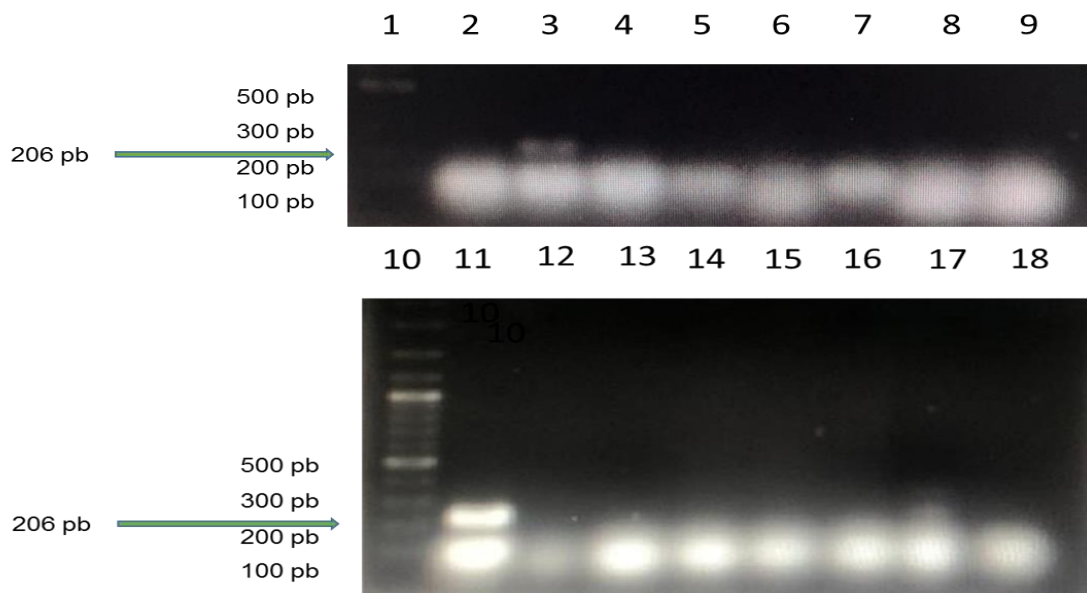
4 Metodos +
3 Metodos +
2 Metodos +
1 Metodo +
+ Positivo
- Negativo
X Muestra Insuficiente

Las enfermedades que se presentan dentro de los resultados positivos por las 4 metodologías son la Enfermedades reumáticas indeterminadas en un 62.5 % (n = 5) y artritis reumatoide en un 37.5% (n = 3).

## 10.6 Identificación de *Mycoplasma fermentans* por PCR punto final

Siguiendo con los trabajos realizados previamente se realizó la identificación de *M. fermentans* a las muestras que dieron resultado positivo para género a alguno de los métodos de identificación, se utilizaron oligonucleótidos específicos para la amplificación del Elemento IS, un fragmento de 206 pb, específico para *M. fermentans*. Se realizó la prueba a 13 muestras, solo el 15 % (n = 2) resultaron positivas para *M. fermentans*. Los dos casos positivos se presentan en Enfermedades reumáticas indeterminadas.

**Ilustración 11** Visualización de productos PCR por corrimiento electroforético en gel de agarosa de *Mycoplasma fermentans*



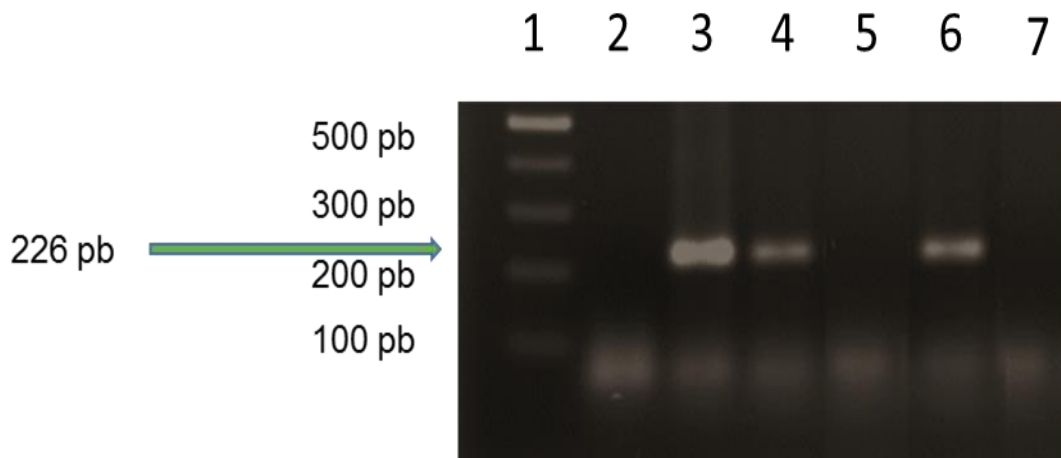
Fuente: Castillo, 2020

**Ilustración 14.** Visualización de productos PCR por corrimiento electroforético en gel de agarosa  
Carril 1 y 10 ppm  
Carril 2: LS002, carril 11: LS009 Muestras positivas a *Mycoplasma fermentans*  
Carriles 4,5,6 muestras negativas a *Mycoplasma fermentans*  
Carril 17 Control positivo (fragmento 206 pb)

### 10.7 Identificación de Virus de Epstein Barr por PCR punto final.

Para la detección de Virus de Epstein Barr se utilizaron oligonucleótidos para la amplificación de un fragmento del gen BALF5 de 229 pb. De las 40 muestras a las que se les realizó el procedimiento 38 de ellas eran líquido sinovial y 2 de sangre venosa. Solo el 10 % (n = 4) de las muestras resulto positiva para VEB de las cuales el 50 % (n = 2) pertenece a pacientes que cursan con artritis reumatoide, el otro 50 % pertenecen a una enfermedad reumática indeterminada y una artritis reactiva. En la ilustración 15 se observa el corrimiento electroforético de las muestras L035 y LS036 que amplificaron un fragmento del gen buscado.

**Ilustración 12 Visualización de productos PCR por corrimiento electroforético en gel de agarosa de Virus de Epstein Barr**



Fuente: Castillo, D (2020)

Ilustración 15. Visualización de productos PCR por corrimiento electroforético en gel de agarosa  
Carril 1 mpm  
Carril 3 LS035 y carril 4: LS036 Muestras positivas a Virus de Epstein Barr  
Carriles 5 muestras negativas a Virus de Epstein Barr  
Carril 6 Control positivo (fragmento 226 pb)  
Carril 7 Control negativo

## 11. Discusión

Actualmente en México 10 de cada 100 personas padece alguna enfermedad de tipo reumático, la existencia de pocos datos epidemiológicos obliga a la recolección de nuevos datos. A pesar de representar el 10 % son enfermedades con una alta tasa de morbilidad y de gran impacto económico, en algunas ocasiones provocando lesiones irreversibles (Hernández, L. 2016) se mencionan que el 80% de los paciente con enfermedades reumáticas experimentan dolor incapacitante, rigidez, disminución en la capacidad funcional, en la mayoría se producirá incapacidad laboral a los 5 años de diagnóstico y más del 50 % reducirá su vida laboral antes de los 10 años de este.

La etiología multifactorial entre lo que destaca la predisposición genética, los factores ambientales, la relación con algunos microorganismos y la alta morbilidad han hecho de estas enfermedades una prioridad para ser estudiadas.

Se estudiaron 35 pacientes de los cuales se recibieron 41 muestras que cumplían con los criterios mencionados con anterioridad, el 63 % pertenece al sexo femenino y nos muestra el predominio de mujeres en padecimientos reumáticos. Hubiera sido de gran importancia el conocimiento de la historia clínica de los pacientes que participaron en el estudio, ya que nos hubiera permitido conocer antecedentes heredo familiares, higiénico- dietéticos y patológicos y determinar si existe alguna variante presente en el grupo de estudio, sin embargo no fue posible, debido a la pandemia el Hospital se convirtió en Hospital COVID y el Dr. Bañuelos reumatólogo que atendió a los pacientes, se jubiló.

De los cuatro padecimientos estudiados, los más frecuentes fueron las enfermedades reumáticas indeterminadas, es decir aquellas muestras que aún no tenían un diagnóstico específico de enfermedad reumática pero que causaban artritis, también fueron consideradas aquí aquellas en cuya solicitud de envío no se mencionada el diagnóstico, seguidas de Osteoartrosis, artritis reumatoide y artritis reactiva.

Se trata de correlacionar la presencia de microorganismos como causantes de padecimientos reumáticos, anteriormente ya se ha estudiado el papel de micoplasmas como agente inductor de estas enfermedades en animales, Rivera y cols intentaron demostrar la capacidad de *M. fermentas* en la inducción de la artritis con la inoculación endotraqueal e intrarticular del microorganismo en conejos donde se analizó la capacidad artritogénica en sinovia y tejidos por medio de cultivo en caldo E y amplificación de DNA por técnica de PCR el microorganismo fue capaz de inducir artritis por las dos vías de inoculación, Se hace énfasis en la detección por técnicas de biología molecular por la dificultad de cultivar a micoplasmas esto debido a sus requerimientos nutricionales.

Para el diagnóstico de micoplasma se requiere de más de dos métodos positivos por lo que se realizaron el cultivo en caldo Eaton, cultivo en agar Eaton, la amplificación de DNA por PCR de la muestra y del cultivo caldo Eaton pasados los 21 días de incubación. Las 41 muestras fueron analizadas por Cultivo de Caldo y agar Eaton, en el caso del Caldo el 17 % se consideraron positivas al cambiar el indicador de pH de rojo a amarillo, se restringieron a enfermedades reumáticas, artritis reumatoide y artritis reactiva no hubo casos positivos en Osteoartrosis; 11 muestras fueron positivas en el cultivo de Agar con la formación de las microcolonias observadas con el microscopio estereoscópico, las muestras positivas se presentaron con distinta frecuencia en todas las enfermedades reumáticas en estudio.

Para la detección biomolecular se analizaron 92 muestras en búsqueda de *Mycoplasma spp*, de las que 7.6% fueron positivas en liquido sinovial, 8 % positivas en Caldo cultivo Eaton y el 0.92 % en sangre venosa, Rivera y col sugirieron que los micoplasmas alcanzan el torrente sanguíneo lo que explicaría la presencia del microorganismo en la única muestra de sangre positiva.

En la comparación de los 4 métodos de identificación utilizados de las 13 muestras que resultaron positivas a algún método, el 39 % fue positiva a los 4 métodos realizados, las muestras del cultivo en Agar Eaton que no fueron positivas a otros métodos de detección, se les realizó una re amplificación del producto amplificado previamente ya que en ocasiones el número de colonias no

es suficiente para realizar un vire en el indicador o para ser detectado en una primera amplificación, se aplicó una excepción de considerarse positiva a todos los métodos diagnósticos a una muestra que fue positiva a 3 de estos y no a 4 por muestra insuficiente, lo que aumento el porcentaje de un 39 a un 61 % de casos positivos detectados por los 4 métodos. Este 61 % se presentó en Enfermedades reumáticas indeterminadas y artritis reumatoide. La detección del microorganismo por los 4 métodos diagnósticos nos ratifica la presencia del microorganismo y nos sugiere la asociación el micoplasma en este tipo de enfermedades reumáticas-

En estudios previos como se ha mencionado se ha considerado el papel de *M. fermentans* como inductor de artritis durante el año 2000 Johnson, expuso al microorganismo en líquido sinovial como causante de artritis reumatoide en este estudio se detectó la presencia de *M. fermentans* en el 91 % de los casos, además durante 2017 Zenteno identificó a esta especie como la de más prevalencia durante su estudio en el 21 % de sus muestras, aunque el objetivo principal de este trabajo no era determinar las especies de micoplasma en muestras positivas quería demostrarse la presencia de cierto porcentaje de esta especie y poder compararla con los estudios previos, solo el 15 % de las 13 muestras analizadas resultaron positivas para *M. fermentans* un resultado similar al obtenido por Zenteno sin embargo no podemos compararlos ya que solo fue analizada esta especie, quedando sin poder determinar si hay otra especie más predominante o si son especies no identificadas.

Algunos virus han sido mencionados como detonadores de enfermedades reumáticas entre ellos el VEB, desde el año 2000 Hans-Detlev Stahl & et investigó la presencia de ADN viral en artritis temprana mediante la técnica de PCR ya que es un microorganismo intracelular que puede mantenerse latente, se observó la presencia de Citomegalovirus, parvovirusB19 y virus de Epstein Barr en muestras sinoviales de pacientes con artritis temprana, en este estudio se analizaron 71 muestras y solo el 15 % de ellas fue positivas para VEB, no realizaron correlación clínica con la enfermedad, contemplaron la posibilidad de que la presencia de ADN viral en diversas artritis, es secundaria a la migración de macrófagos u otras células, que albergan ADN viral, en el compartimento sinovial. Del

mismo modo, este mecanismo podría explicar la presencia de ADN bacteriano en muestras de pacientes con artritis. Durante el 2019 Nuez M estudio la asociación de VEB y *C. trachomatis* a enfermedades reumáticas, encontrando un 35 % en líquido sinovial y un 19 % sangre la presencia de VEB indicando la posible asociación, en este estudio si se realiza una correlación clínica con las enfermedades reumáticas, presentándose el microorganismos en Osteoartrosis, y artritis reumatoide se supuso que los linfocitos B infectados viajan por el torrente sanguíneo hasta llegar a las articulaciones donde, al tratarse de un tejido blando, los componentes del sistema inmunitario atacan fácilmente provocando la inflamación, además de tomar en consideración al factor de HLA B 27

En este estudio se examinaron 40 muestras para la detección del VEB de ellas 38 eran líquido sinovial y 2 de sangre venosa, solo el 10 % fue positiva en líquido sinovial y ninguna fue positiva en las muestras de sangre comparada con los estudios previos para nosotros fue desconocido en que momento de la enfermedad fue tomada la muestra, el porcentaje de positivos fue similar al obtenido por Hans-Detlev Stahl & et y menor en el caso de Núñez, haciendo una correlación con las enfermedades en las que se presentaron los casos positivos, el 50 % fue positivo en artritis reumatoide el resto entre artritis reactiva y enfermedad reumática no determinada, no hubo detección positiva en osteoartrosis Llama la atención una muestra que presenta detección positiva para VEB y mycoplasma por cultivo de caldo y agar Eaton, lo cual podría sugerirnos una probable coinfección. Sin embargo no puede asegurarse ya que no fue corroborada.

## 12. Conclusiones

- Se logró aislamiento de *Mycoplasma spp* en las muestras recibidas y analizadas por distintas metodologías.
- El diagnóstico de *Mycoplasma spp* por medio de cultivo en Agar fue más eficaz comparado con el Caldo.
- Las muestras positivas a *Mycoplasma spp* por medio de cultivo se presentaron con mayor frecuencia en Enfermedades Reumáticas indeterminadas.
- De los tipos de muestra utilizados para el diagnóstico de *Mycoplasma spp* por PCR se detectaron con más frecuencia los casos positivos en Caldo de Cultivo Eaton.
- El diagnóstico por los 4 métodos descritos aumenta la sensibilidad y especificidad.
- Los resultados positivos a *Mycoplasma spp* por las 4 metodologías se presentan con más periodicidad en Enfermedades Reumáticas indeterminadas y artritis reumatoide.
- Si hubo detección *M. fermentans* en muestras positivas, pero no puede corroborarse que sea la más frecuente ya que no hubo comparación con otros géneros.
- Las muestras positivas a *M. fermentans* son pertenecientes a Enfermedades Reumáticas Indeterminadas.
- Se detecta Virus de Epstein Barr en menor frecuencia en comparación con *Mycoplasma spp*.
- De las muestras positivas a VEB no hay una enfermedad reumática predominante.
- Se presenta una coinfección producida por VEB y *Mycoplasma spp* en una muestra de Artritis Reactiva.

### **13. Perspectivas**

- Estandarizar las condiciones para la detección de *C. trachomatis* y *C. pneumoniae*, realizar un estudio posterior con las muestras ya estudiadas para los otros microorganismos y detectar la presencia de coinfecciones.
- Correlacionar datos obtenidos por medio de la historia clínica con muestras positivas, tratando de detectar si hay alguna variante ambiental, genética u otra, que se presente en más de uno de los casos.

## 14. Bibliografía

- Acosta Boga, B., Codina Grau, M. G., Matas Andreu, L., & Meseguer Peinado, M. A. (2011). Diagnostico Microbiologico de las infecciones por Mycoplasma Spp y Ureaplasma Spp. En E. Cercenado, & R. Cantón (Ed.), *Procedimientos en Microbiología Clínica* (págs. 2-29). España: Seimc. Recuperado el 2018, de <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia40.pdf>
- Arthritis Foundation. (2016). *Arthritis Foundation*. Obtenido de <http://espanol.arthritis.org/espanol/laarthritis/quienes-somos-que-es-arthritis/arthritis-cifras/>
- Asociación Mexicana de Familiares y Pacientes con Artritis Reumatoide A.C. (AMEPAR) . (2020). Obtenido de <https://amepar.org.mx/cifras-en-mexico/>
- Balandraud, N., & Roudier, J. (Julio de 2004). Virus de Epstein-Barr y artritis reumatoide. *Revisiones de autoinmuidad*, 3(5), 362-367. doi:<https://doi.org/10.1016/j.autrev.2004.02.002>
- Belmonte, M. A., Castellano, J. A., Román, J. A., & Rosas, J. C. (2013). Enfermedades Reumáticas. En I. & Plaza (Ed.), *Enfermedades Reumáticas (Actualización SRV)* (págs. 13-679). Madrid, España: Narcea. Obtenido de <https://svreumatologia.com/wp-content/uploads/2015/06/Actualizacion-Enfermedades-Reumaticas-Actualizacion-SVR-II-Edicion.pdf>
- Cabrera Maldonado, C., Luzuriaga Galicia, J., León Tello , G., Alvarez Lopez , J. M., Tellez Osorio , C., & Pérez Fenandez, M. S. (Marzo de 2001). Manual de Bacteriología. *Fac C Qs Dpto de Microbiología*. Puebla, Puebla, México: Benemerita Universidad Autonoma de Puebla. Obtenido de [http://www.facultadcienciasquimicas.buap.mx/ligas/acredita/QFB/data/4\\_2%20Curriculum/4.2.10%20%20Actas%20de%20%20C3%A1reas%20Programas%20de%20asig%20y%20Manuales%20Lab/Manuales%20de%20Laboratorio/Microbiolog%C3%ADaLab-pdf/Manual%20%20Bacteriolog%C3%ADa%20I](http://www.facultadcienciasquimicas.buap.mx/ligas/acredita/QFB/data/4_2%20Curriculum/4.2.10%20%20Actas%20de%20%20C3%A1reas%20Programas%20de%20asig%20y%20Manuales%20Lab/Manuales%20de%20Laboratorio/Microbiolog%C3%ADaLab-pdf/Manual%20%20Bacteriolog%C3%ADa%20I).
- Cervantes, E. (Noviembre de 2009). Micoplasmas patógenos para el humano. *Rev Fac Med UNAM*, 2(6), 253-257. Obtenido de <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no52-6/RFM052000604.pdf>
- Chabay, P., & Preciado, M. V. (09 de Enero de 2016). Epidemiology of Epstein-Barr virus-associated pediatric lymphomas from Argentina. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 73(1), 47-54. doi:<http://doi.org/10.1016/j.bmhimx.2015.12.002>
- Chavarria, I. V. (2019). Detección de Micoplasmas y Anticuerpos contra micoplasmas en Pacientes Reumáticos . *Tesis Maestría*. Puebla, Puebla, México: Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Benemerita Universidad Autonoma de Puebla .

- DBpedia. (2010). *Mycoplasma*. Obtenido de DBpedia: <http://es-la.dbpedia.org/page/resource/Mycoplasma>
- Duran, M., González-Haba, E., Herranz, A., & Pern, S. (2002). Reumatología. *Farmacia Hospitalaria*, *II*, 1465-1467. Recuperado el 03 de 2020, de <http://medsol.co/informacion/flumida/reumatologia.pdf>
- EcuRed contributors. (17 de Noviembre de 2017). *Mycoplasma*. Obtenido de EcuRed: <https://www.ecured.cu/Mycoplasma>
- Espinoza, L. R., & García-Valladares, I. (Julio de 2013). Of bugs and joints: The relationship between infection and joints. (238, Ed.) *Reumatología Clínica*, *9*(4), 229. doi:<https://doi.org/10.1016/j.reuma.2012.06.008>
- Fernández Carballido, C., Martín Domenech, R., & San Martín, A. (s.f.). Espodilitis anquilosante y espondiloartritis axiales. En *Enfermedades Reumáticas: Actualización SVR* (págs. 533-560). San Juan Alicante.
- Fundación Española Reumatología. (F de 2020). *Tipos de Enfermedades Reumáticas*. Obtenido de Fundación Española Reumatología: <https://inforeuma.com/enfermedades-reumaticas/>
- Grupo Científico de la OMS en Enfermedades Reumáticas. (1992). *Enfermedades Reumáticas*. Organización Mundial de la Salud . Ginebra: Panamericana de la Salud . Obtenido de [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39682/9243208160\\_spa\\_pdf.jsessionid=5F3A6386AD717762472E33871E33871EC4F0FE?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39682/9243208160_spa_pdf.jsessionid=5F3A6386AD717762472E33871E33871EC4F0FE?sequence=1)
- Gutiérrez, F. Q. (2004). *Anatomía Humana* (4ta ed., Vol. 1). México, México: Porrua. Recuperado el 2020
- Gwynedd A. Benders, B. C. (Julio de 2005). Análisis transcripcional del grupo de genes ftsZ conservados en *Mycoplasma genitalium* y *Mycoplasma pneumoniae*. (A. S. Microbiology, Ed.) *Journal of Bacteriology*, *187*(13), 4542-4551. doi:10.1128/JB.187.13.4542-4551.2005
- Instituto Valenciano de Microbiología. (24 de 06 de 2018). *IVAMI*. Obtenido de <https://www.ivami.com/es/microbiologia-clinica/5690-Mycoplasma-fermentans-infecciones-respiratorias-y-genitourinarias-diagnostico-molecular-pcr-identificacion-de-especie-pcr-y-secuenciacion>
- Johnson, S., Sidebottom, D., Bruckner, F., & Collins, D. (2000). Identification of *Mycoplasma fermentans* in synovial fluid samples from arthritis patients with inflammatory disease. *J Clin Microbiol*, *38*(1), 90-93. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10618069/>
- Jordá, G. B., Hanke, S. E., Ramos-Ricon, J. M., Mosmann, J., López, M. L., Entrocassi, A. C., & Cuffini, C. (Febrero de 2018). Prevalencia y análisis filogenético de *Chlamydia trachomatis* en una población de mujeres de Posadas, Misiones. *Rev Esp Quimioter.*, *31*(1), 21-26. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6159361/>
- Kornspan, J., & Rottem, S. (2012). El perfil de fosfolípidos de *Mycoplasmas*. *Diario de Lípidos*, *2012*, 1-6. doi:doi: 10.1155 / 2012/640762

- Lenzo, H., Moog, U., Henning, K., Lederbach, R., Roland, D., Menge, C., . . . Sprague, L. D. (2011). Alta frecuencia de coinfecciones por clamidias en rebaños de ovejas clínicamente sanos. *BMC Vet Res*, 7(29), 1-13. doi:<https://doi.org/10.1186/1746-6148-7-29>
- Lluch, M. (1 de julio de 2010). Estudio de la Expresión Génica y la División Celular en *Mycoplasma genitalium*. *Tesis Doctoral*, 3-32. (U. A. Barcelona, Ed.) Barcelona, Barcelona, España: Instituto de Biotecnología y Biomedicina. Obtenido de [https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2011/hdl\\_10803\\_3635/mls1de1.pdf](https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2011/hdl_10803_3635/mls1de1.pdf)
- Loomis, W. P., & Starnbach, M. (Febrero de 2002). Respuestas de células T a *Chlamydia trachomatis*. *Current Opinion in Microbiology*, 87-91. doi:[https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00291-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00291-6)
- Lorenzetti, M. A., Gantuz, M., Altchek, J., De Matteo, E., Chabay, P. A., & Preciado, M. V. (28 de Diciembre de 2011). Distinctive Epstein-Barr Virus Variants Associated with Benign and Malignant Pediatric Pathologies: LMP1 Sequence Characterization and Linkage with Other Viral Gene Polymorphisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 609-618. doi:10.1128 / JCM.05778-11
- Martínez Larrarte, J. P., Reyes, P. Y., & Prada Hernandez, D. (Junio de 2007). Aspectos Teórico-Prácticos de la inflamación en enfermedades reumáticas. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 23(2), 10. Obtenido de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-21252007000200014](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252007000200014)
- Mendoza Montero, J., & Rojas González, A. (s.f.). *DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE EPSTEIN-BARR*. Obtenido de Departamento de Investigación y Desarrollo. Vircell S.L. Granada: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/serologia/ebvrev.pdf>
- Merino, F. (1984). Virus de Epstein-Barr, inmunodeficiencia y síndromes linfoproliferativos. *INMUNOLOGÍA*, 2(2), 31-40. Obtenido de <https://inmunologia.org/Upload/Articles/1/0/100.pdf>
- Nuñez, M. (2019). Detección Virus Epstein Barr y *Chlamydia trachomatis* por PCR punto final en muestras de líquido sinovial de pacientes con enfermedades reumáticas. *Tesis Licenciatura*. Puebla, Puebla, México: Facultad Ciencias Biológicas, Benemerita Universidad Autónoma de Puebla .
- Plata, L. M., Oviedo, J. F., & Rincon-Orozco, B. (09 de Julio de 2018). Revisión sistemática: estrategias virales para la inducción de cáncer “virus de Epstein-Barr: latencia y mecanismos asociados a la oncogénesis viral”. *Revista de la Universidad Industrial de Santander*, 3, 257-266. doi:<http://dx.doi.org/10.18273/revsal.v50n3-2018010>
- Qingzhou, C., Wenbin, L., Lijuan, W., Rongfu, T., Jun, W., Wenqian, K., . . . Runlei, D. (Agosto de 2017). La desacetilasa de *Mycoplasma fermentans* promueve la tolerancia al estrés de células de mamíferos. *Microbiological Research*, 1-11. doi:<https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.04.010>
- Razin, S. Y. (1998). Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4), 1094-1156. doi:10.1128/MMBR.62.4.1094-1156.1998

- Rivera Tapia , J. A., & Cedillo Ramirez, L. (Abril-Junio de 2005). Artritis reactiva y microorganismos. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 52(2), 76-79. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2005/pt052b.pdf>
- Rivera Tapia , J. A., Cedillo Ramirez, L., Bermejo Zapata, D., & Giondo-Cerezo, S. (Julio-Septiembre de 2006). Papel Mycoplasma fermentans en patologías gastrointestinales y su relación con la artritis reactiva. *Rv Mx Patol Clin*, 53(3), 134-138. doi:<https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2006/pt063b.pdf>
- Rivera Tapia, J. A. (01 de 2003). Diagnóstico molecular de Mycoplasma fermentans en pacientes con artiritis . *Gaceta Médica de México*, 139(1), 85-86. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2003/gm031n.pdf>
- Rivera, J. A., & Cedillo, M. L. (Abril-Junio de 2006). Comparación genómica en micoplasmas de interés médico. *Anales Médicos*, 51(2), 74-79. Obtenido de <https://pdfs.semanticscholar.org/e0fa/d4903e7827eb327206d378d22c78511cda70.pdf>
- Rivera, J. A., Yáñez, A., León-Tello, G., Gil, C., Giono, S., Barba , E., & Cedillo , M. L. (3 de Junio de 2002). Artritis experimental inducida por un aislado clínico de Mycoplasma fermentans. *BMC Musculoskelet Disord*, 3(15), 1-7. doi:<https://doi.org/10.1186/1471-2474-3-15>
- Rodríguez-Domínguez, M., Galán, J. C., Sanbinmatsu, S., Salinas, J., Alonso, R., & Gutiérrez, J. (junio de 2014). Diagnóstico microbiológico de las infecciones por Chlamydia spp. y especies relacionadas. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 32(6), 380-385. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.01.015>
- Sawada, S., & Takei, M. (Febrero de 2005). Epstein-Barr virus etiology in rheumatoid synovitis. *Revisiones de autoinmunidad*, 4(2), 106-110. doi:<https://doi.org/10.1016/j.autrev.2004.08.034>
- Serra Valdés, M. A. (30 de junio de 2013). Las enfermedades Reumáticas: de la teoría a la realidad. *Finlay*, 3(4), 272-275. Recuperado el 2020, de <http://www.revfinlay.sld.cu/index.php/finlay/article/view/245>
- Sidhu, M. K., Rashidbaigi, A., Testa, D., & Liao, M. J. (2 de Mayo de 1995). Estándares internos de la competencia para la detección cuantitativa de ADN de micoplasma. *FEMS Microbiology Letters*, 207-211. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07524.x>
- Stahl, H.-D., Hubner, B., Seidl, B., Liebert, U. G., Van der Heijden, I. M., Wilbrink, B., . . . Tak, P. P. (1 de Mayo de 2000). Detección de múltiples especies de ADN viral en tejido y líquido sinovial de pacientes con artritis temprana. *Ann Rheum*, 59, 342-346. doi:<http://dx.doi.org/10.1136/ard.59.5.342>
- Tanaka, T., Kogawa, K., Sasa, H., Nonoyama, S., Furuya, K., & Sato, K. (2009). Rapid and simultaneous detection of 6 types of human herpes virus (herpes simplex virus, varicella-zoster virus, Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, human herpes virus 6A/B, and human herpes virus 7) by multiplex PCR assay. *Biomedical Research*, 30(5), 279-285. doi:<https://doi.org/10.2220/biomedres.30.279>

- Tinoco Racero, I., Caro Gómez, N., Rodríguez Leal, C., & López Tinoco, E. (11 de Marzo de 2014). Infecciones por el virus de Epstein-Barr y citomegalovirus. *Medicine*, 11(50), 2954-2964. doi:doi: 10.1016/S0304-5412(14)70722-X
- Toledo, A. &. (21 de Diciembre de 2015). Hijacking and Use of Host Lipids by Intracellular Pathogens. *Microbiology spectrum*. (A. S. Press, Ed.) *Microbiology spectrum*, 3(6), 1-22. doi:10.1128 / microbiolspec.VMBF-0001-2014
- Torres Espindola, L. M., Arellano Galindo, J., Velazquez Cruz, R., & Castillejos López, M. J. (2013). Factores que participan en la interacción huésped-agente patógeno en el riesgo de Linfoma de Hodgkin inducido por el virus Epstein Barr. *Investigación Clínica*, 54(3), 311-324. Obtenido de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0535-51332013000300008&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332013000300008&lng=es&tlng=es).
- Toussirot, É., & Roudier, J. (Octubre de 2008). Virus de Epstein-Barr en enfermedades autoinmunes. *Mejores Prácticas e Investigación en Reumatología Clínica*, 22(5), 883-896. doi:<https://doi.org/10.1016/j.berh.2008.09.007>
- Universidad de Salamanca . (03 de 2000). *Control Calidad Muestras* . Obtenido de Banco Nacional ADN Carlos III: <http://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf>
- Wang, R. Y., Hu, W. S., Dawson, M. S., Shih, J. W., & Lo, S. C. (Enero de 1992). Detección selectiva de *Mycoplasma fermentans* por reacción en cadena de la polimerasa y mediante el uso de una secuencia de nucleótidos dentro del elemento similar a la secuencia de inserción. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(1), 245-248. doi:<https://jcm.asm.org/content/jcm/30/1/245.full.pdf>
- You, X.-x., Zeng, Y.-h., & Wu, Y.-m. (2006). Interacciones entre las proteínas de membrana asociadas a lípidos de micoplasma y las células huésped. *Journal of Zhejiang University Science*, 7(5), 342-350. doi:<https://doi.org/10.1631/jzus.2006.B0342>
- Zenteno, D. (2017). Papel de la apolipoproteína E y los micoplasmas en las enfermedades reumáticas. *Tesis Maestría*. Puebla, Puebla, México: Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas, Benemerita Universidad Autónoma de Puebla.

**ANEXOS**

## ANEXO 1 Carta de consentimiento informado

Mediante la firma de este documento, doy mi consentimiento para participar en el proyecto de investigación "FRECUENCIA DE *Mycoplasma spp*, *Chlamydia spp* Y Virus De Epstein Barr EN PACIENTES CON DIVERSAS ENFERMEDADES REUMÁTICAS", el cual está realizando la Dra. María Lilia Cedillo Ramírez y su grupo de investigación del instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP-ICUAP), en colaboración con el Dr. David Bañuelos Ramírez del Servicio de Reumatología del Hospital General San José del Instituto Mexicano del Seguro Social de Puebla (IMSS). Este estudio pretende relacionar la causalidad entre microorganismo y enfermedad reumática.

Entiendo que mi participación será permitiendo que los investigadores me tomen una muestra de sangre y/o líquido sinovial, esto no repercute en mi integridad física o daño a la salud, ni en lo económico ya que los estudios que se realizarán serán costeados por la BUAP. Es también de mi consentimiento que los investigadores pueden ponerse en contacto conmigo en el futuro para saber de los resultados obtenidos y a fin de obtener mayor información acerca de la enfermedad, para que estos ayuden en caso de resultar como causales, dar un diagnóstico y tratamiento oportuno.

Fui elegido(a) para participar en este estudio porque padezco de enfermedad reumática de tipo inflamatorio y seré parte de un grupo de personas que asistimos a consulta periódica a esta unidad de reumatología.

He concedido libremente mi participación en el estudio. Se me ha informado que es totalmente voluntaria y que aun después de iniciado el estudio, puedo rehusarme a participar o contestar preguntas en el momento que yo decida. Se me ha notificado también que los resultados obtenidos en el estudio son confidenciales y que mi nombre no será publicado en ningún informe y que además si rehusó a participar, no me será afectado de ninguna manera.

También he sido informado que mi participación es voluntaria y que no recibiré ninguna compensación económica, así mismo, el tratamiento que recibo no se verá alterado y los resultados de la investigación me serán proporcionados si los solicito a esta Unidad Reumatológica o al ICUAP con la Dra. María Lilia Cedillo Ramírez al teléfono 2295500 ext 2539.

Fecha:

---

Nombre y firma del paciente

Dra. María Lilia Cedillo Ramírez  
Centro de Investigaciones en Ciencias  
Microbiológicas Instituto de Ciencias BUAP

---

## Anexo 2. Preparación medio de Cultivo Eaton con Glucosa

Cantidades necesarias para la preparación de 100 ml de medio de cultivo

Reactivo	Caldo Eaton	Agar Eaton
Agua tridestilada	60 ml	60 ml
Medio PPLO (Difco)	3 g	3g
Dextrosa	0.5 g	0.5 g
Agar	-	1.5 gr
Rojo de Fenol al 0.4 %	1 ml	-
Suero de caballo filtrado	30 ml	30 ml
Dializado de levadura	10 ml	10 ml
Penicilina G 5,000,000 UI	2000 UI (0.1g)	2000UI (0.1g)

1.- En la balanza granataria se realiza el pesaje del medio PPLO (Difco), dextrosa. Se le adiciona el agua tridestilada.

2. Para la preparación de Caldo Eaton se le agrega a la mezcla el rojo fenol hasta homogenizar la mezcla,

para el Agar Eaton a la mezcla se le agrega el Agar base se mezcla hasta clarificar y en caso de ser necesario se calienta la solución evitando que hierva o se derrame.

3.- Se esterilizan ambas mezclas en autoclave a 15 libras de presión / 121 °C durante 15 minutos. Se deja enfriar a temperatura ambiente, evitando que el agar gelifique.

4. Se pesa en la balanza analítica 0.1 gr de Penicilina G, con condiciones de esterilidad se agrega a las muestras.

5.- En las mismas condiciones se agrega a los medios los dializados de levadura y el suero de caballo (a temperatura ambiente), se mezcla homogéneamente, se coloca en la incubadora por 24 h a 37°C como prueba de esterilidad.

6.- El agar se coloca en placas de Petri, el caldo se coloca en alícuotas de 50 ml, cerradas herméticamente, se conservan a 4°C hasta su uso.

Preparación Dializado Levadura:

1.- Se disuelven 100 g de levadura seca en 250 ml de agua tridestilada.

2.- Se coloca en el fuego a 115 °C durante 5 min.

3.- Se coloca la preparación dentro de la membrana de celofán, se cierra de ambos lados muy bien.

4.- Se introduce en 500ml de agua destilada cubriendo la membrana a 4° C durante 48 h permitiendo el proceso de diálisis.

5.- pasadas las 48 h se coloca el dializado en alícuotas de 50 ml.

6.- Se esterilizan a 121°C por 15 minutos.

7.- Se conservan a 4°C hasta su uso.

### **Anexo 3 Extracción DNA por método de Kit comercial High Pure PCR Template de Roche**

A 300 µl de muestra líquido sinovial o sangre se le adicionaron 200 µl de Buffer de unión, 50 µl de proteinasa K, se mezcla inmediatamente y se incuba por 10 min a 70 °C.

Se adicionan 100µl de isopropanolol, se mezcla y se trasfiere a la columna de extracción, con el filtro de alta pureza, se centrifuga a 8000 rpm durante 1 minuto, se descarta en sobrenadante y el tubo recolector.

Agregar 500 µl de Buffer removedor de inhibidores, se centrifuga a 8000 rpm durante 1:10 minutos se descarta en sobrenadante y el tubo recolector.

Colocar 500 µl de Buffer de lavado, se centrifuga a 8000 rpm durante 1:10 minutos se descarta en sobrenadante y el tubo recolector.

Nuevamente se colocan 500 µl de Buffer de lavado, se centrifuga a 8000 rpm durante 1:10 minuto se descarta en sobrenadante y el tubo recolector.

Centrifugar a 13,000 rpm por 1:10 minutos para la eliminación de exceso de buffer. Se cambia la columna a un tubo Eppendorf nuevo esterilizado y se adicionan 200 µl d buffer de elución previamente calentado a 70°C, esperar un minuto sin movilizar y se centrifuga a 8000 rpm durante 1:10 minutos para la obtención del material genético.

Se almacena ADN obtenido a -20°C hasta su utilización.

### **Anexo 4 Extracción DNA por Choque Térmico**

- 1.- Centrifugar muestras Caldo Eaton a 18,000rpm durante 25 a 30 min a 4°C
- 2.- Se retira y desecha sobrenadante con ayuda de icropipeta quedándose con el Pellet
- 3.- Adicionar 100 µl de Agua inyectable estéril Pisa, mezcla por aproximadamente 20s hasta la disolución del pellet.
- 4.- Se coloca en Termomixer Eppendorf a una temperatura de 95 °C con agitación durante 10 a 12 minutos.

5.- Centrifugar a 12,000rpm por 10 minutos, se deja enfriar a temperatura ambiente, se coloca el sobrenadante en tubos Eppendorf estéril y se conservan a -20°C hasta su uso.