BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

"La tierra no es de nosotros, nosotros somos de la tierra"

Aislamiento de Mycoplasma spp en pacientes con asma y rinitis alérgica y el papel de los factores ambientales en sus exacerbaciones

TESIS

Que para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES

Presenta

GUILLERMO MUÑOZ ZURITA

Asesora de tesis:
Dra. María Lilia Cedillo Ramírez

Septiembre 2014

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

"La tierra no es de nosotros, nosotros somos de la tierra"

Aislamiento de Mycoplasma spp en pacientes con asma y rinitis alérgica y el papel de los factores ambientales en sus exacerbaciones

TESIS

Que para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES

Presenta

GUILLERMO MUÑOZ ZURITA

Comité tutoral:

Asesora y Tutora	Dra. María Lilia Cedillo Ramírez
Integrante Comité Tutoral	Dr. José Luis Morán Perales
Integrante Comité Tutoral	Dr. Jorge Antonio Yáñez Santos

Septiembre 2014

BUAP

M.C. Guillermo Muñoz Zurita
P R E S E N T E:

Por este conducto me permito comunicarle que los miembros del jurado integrado por:

Dr. Elías Pezzat Said	Presidente
Dra. Elsa Iracena Castañeda Roldán	Secretario
Dra. Sonia Emilia Silva Gómez	1er. Vocal
Dra. María del Consuelo Yáñez Santos	2do. Vocal
Dr. Jorge Antonio Yáñez Santos	3er. Vocal
Dra. Gladys Linares Fleites	1er. Suplente
Dra. Edith Chávez Flores	2do. Suplente

designado para la defensa de su tesis *"Aislamiento de Mycoplasma spp en pacientes con asma y rinitis alérgica y el papel de los factores ambientales en sus exacerbaciones"*, han manifestado mediante su voto que ésta cumple con los méritos suficientes para ser defendida como tesis de grado de Doctorado en Ciencias Ambientales, por lo que este Posgrado le autoriza la impresión de la misma.

Sin otro asunto en lo particular, quedo de usted.

A t e n t a m e n t e
"Pensar Bien, Para Vivir Mejor"
H. Puebla de z., Septiembre 10 de 2014

Dr. J Santos Hernández Zepeda
C o o r d i n a d o r

JSHZ/anma
c.c.p. Archivo
c.c.p. Minutario

Instituto de Ciencias
Edif. 103 E, Ciudad Unviersitaria,
Col. San Manuel, Puebla, Pue.
C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 7050 y 7051

AGRADECIMIENTOS

Al área de servicio de Alergología del Hospital Universitario de Puebla, por permitir llevar a cabo la toma de muestras utilizadas en el presente estudio.

Al CONACyT por la beca de Doctorado en Ciencias Ambientales con número de registro 143804.

Al comité tutorial integrado por la Dra. María Lilia Cedillo Ramírez, Dr. José Luis Morán Perales y al Dr. Jorge Antonio Yáñez Santos por la revisión de esta tesis de Posgrado.

Al Dr. David Paz Martínez por su apoyo para la realización de esta proyecto de investigación.

DEDICATORIA

A las dos mujeres y al hombre más importantes en mi vida:

A mi Esposa y Mama de mí bebe: Norma Elena Rojas Ruíz

A mi Mamá: Amparito Zurita Vda. De Muñoz

A mi Papa: Guillermo Muñoz Romero +

Porque cuando estuve a punto de claudicar su amor, su apoyo y sus consejos me llevaron a lograr este objetivo en mi vida.

A mis Hermanos:

Alex; Hilda; Ana luz; Karin

Por su cariño, comprensión y confianza que siempre me han tenido

A mis bebes:

Hami; Alejandrita; Andreita y ahora mi Cosita

Por su amor y ejemplo de vida

Con especial cariño a:

Doña Elenita; Tía Elvira y Reyna

Por elevar sus oraciones todos los días por el bien de mi familia.

"A veces uno realiza un hallazgo cuando no lo está buscando."

Alexander Fleming

I. ÍNDICE GENERAL

		Página
I	INDICE GENERAL	i-iii
II	ÍNDICE DE FIGURAS.	iv
III	ÍNDICE DE TABLAS.	v
IV	ÍNDICE DE ABREVIATURAS.	vi
	RESUMEN	vii
1	INTRODUCCIÓN.	1
1.1	Relación de la prevalencia del asma y la rinitis alérgica con los factores ambientales.	1
1.2	Asma y rinitis alérgica como problemas de salud	3
1.3	Clasificación taxonómica de los micoplasmas	5
1.4	Características microbiológicas de los micoplasmas	7
1.5	Micoplasmas aislados en el ser humano y sus factores de virulencia	9
1.6	Relación de los micoplasmas con el asma y las enfermedades respiratorias	13
1.7	Muestras biológicas para aislamiento de micoplasmas en laboratorio	14
1.8	Características genéticas de los micoplasmas	14
1.9	Caracterización molecular de los micoplasmas	17
2	JUSTIFICACIÓN.	18
3	HIPÓTESIS.	19

4	OBJETIVOS.	20
5	ESQUEMA DE TRABAJO.	21
6	MATERIALES Y MÉTODOS.	22
6.1	Diseño del Estudio	22
6.2	Diagnóstico de pacientes con rinitis alérgica y asma.	23
6.3	Método de Recolección de muestras:	23
6.4	Criterios éticos del estudio	23
6.5	Aislamiento microbiológico de *Mycoplasma spp a partir* de muestras de exudado faríngeo y orina	24
6.6	Detección de *Mycoplasma spp* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	25
6.7	Prueba cutánea de Prick en pacientes para la determinación de su sensibilidad ante extractos de alérgenos ambientales.	26
7	RESULTADOS	28
7.1	Aislamiento de *Mycoplasma spp* en pacientes asmáticos y con rinitis alérgica en muestras de exudado faríngeo y orina.	28
7.2	Detección de *Mycoplasma spp* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	35
7.3	Prueba de sensibilidad de Prick a extractos de alérgenos ambientales en pacientes asmáticos, con rinitis alérgica y sanos.	36
8	DISCUSIÓN.	48
9	CONCLUSIONES.	55
10	PERSPECTIVAS	57

11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 58

12 ANEXOS 67

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Número de figura	Título de la figura	Página
1	Clasificación taxonómica de la clase Mollicutes.	6
2	Comparación de la estructura membranal entre bacterias Gram negativas, positivas y micoplasmas.	8
3	Esquema del procedimiento de la Prueba de Prick.	27
4	Comparación del aislamiento de *Mycoplasma spp* en muestras de exudado faríngeo y orina de pacientes asmáticos masculinos y femeninos	32
5	Comparación del aislamiento de *Mycoplasma spp* en muestras de exudado faríngeo y orina de pacientes con rinitis alérgica masculinos y femeninos	34
6	Comparación del aislamiento de *Mycoplasma spp* en muestras de exudado faríngeo y orina de pacientes sanos masculinos y femeninos.	35
7	Gel de agarosa con el amplicon de 301 pb del gen ARNr 16S.	36
8	Esquema de comparación en número de pacientes asmáticos positivos al aislamiento de *Mycoplasma spp* y su susceptibilidad ante extractos de alérgenos ambientales.	46
9	Esquema de comparación en número de pacientes con rinitis alérgica positivos al aislamiento de *Mycoplasma spp* y su susceptibilidad ante extractos de alérgenos ambientales.	47

III. ÍNDICE DE TABLAS

Número de tabla	Título de la tabla	Página
1.	Micoplasmas de interés médico, sitio anatómico primario de colonización y sustrato metabólico que requieren.	10
2	Propiedades de los mollicutes representativos.	16
3	Aislamiento de *Mycoplasma spp* en pacientes masculinos asmáticos, con rinitis alérgica y sanos, por grupo de edad en muestras de exudado faríngeo y orina.	29
4	Aislamiento de *Mycoplasma spp* en pacientes femeninos asmáticos, con rinitis alérgica y sanos, por grupo de edad en muestras de exudado faríngeo y orina.	30
5	Aislamiento de *Mycoplasma spp* y su porcentaje en muestras de exudado faríngeo y orina de pacientes asmáticos, con rinitis alérgica y sanos.	31
6	Sensibilidad a extractos de alérgenos intradomiciliarios en pacientes masculinos asmáticos, con rinitis alérgica y sanos.	38
7	Sensibilidad a extractos de alérgenos intradomiciliarios en pacientes femeninos asmáticas, con rinitis alérgica y sanas.	39
8	Sensibilidad a extractos de alérgenos forestales intra y/o extradomicilarios en pacientes masculinos asmáticos, con rinitis alérgica y sanos.	40
9	Sensibilidad a extractos de alérgenos forestales intra y/o extradomicilarios en pacientes asmáticos, con rinitis alérgica y sanos.	42
10	Sensibilidad a extractos de alérgenos de tipo maleza en pacientes masculinos asmáticos, con rinitis alérgica y sanos.	43
11	Sensibilidad a extractos de alérgenos de tipo maleza en paciente asmáticas, con rinitis alérgica y sanas.	44

IV. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado de la abreviatura
IgE	Inmunoglobulina E
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
GINA	Iniciativa Global para el Asma
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
VIH	virus de inmuno deficiencia adquirida
SIDA	Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida
ATP	Adenosin Tri fosfato
$C0_2$	Dióxido de carbono
NH_3	Amoniaco
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Kb	Kilo base
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
HUP	Hospital Universitario de Puebla
G	Gramo
Ml	Mililitro
Mm	Milímetro

RESUMEN

El asma y la rinitis suponen un problema de salud, son enfermedades muy comunes en todo el mundo, que afectan al menos del 10 al 30% de la población, y su prevalencia está aumentando. Las exacerbaciones asmáticas están vinculadas con mayor frecuencia a la presencia de virus y bacterias como *M. pneumoniae* y *M. fermentans* sin embargo, se desconoce si *Mycoplasma spp* participa en la fisiopatología de la rinitis alérgica. Por este motivo fue de importancia en el presente estudio aislar al microorganismo *Mycoplasma spp* en las muestras de exudado faríngeo y orina de 120 pacientes con asma, 211 con rinitis alérgica y 171 pacientes sanos como grupo control.

Diversos estudios indican que los factores ambientales tales como la presencia de microorganismos, insectos, la diversidad de plantas y árboles entre otros; desempeñan un papel relevante en la etiología del asma y la rinitis alérgica, por lo cual en el presente estudio se determinó la susceptibilidad de aquellos pacientes asmáticos y con rinitis alérgica que resultaron positivos al aislamiento de *Mycoplasma spp* ante la exposición a extractos de alérgenos ambientales de tres tipos: intradomiciliarios, forestales y de tipo maleza. Los resultados indicaron que se aisló *Mycoplasma spp* en el 29% de muestras de pacientes asmáticos, el 38% en pacientes con rinitis alérgicas y 4% en el grupo de pacientes sanos. Los pacientes que cursaban con exacerbaciones de asma o rinitis alérgica fueron susceptibles a los extractos de diversos alérgenos ambientales principalmente al de ácaro, trueno y pasto, en una mayor proporción, con respecto a los pacientes sanos, que fueron susceptibles sólo al extracto del alérgeno ácaro y resultaron insensibles a todos los demás extractos probados. Con los resultados obtenidos fue posible concluir que es posible que exista una relación en la prevalencia entre el aislamiento de *Mycoplasma spp* y las exacerbaciones del asma y la rinitis alérgica.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Relación de la prevalencia del asma y la rinitis alérgica con los factores ambientales.

El Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud (CENETEC) en su catálogo maestro de Guías de Práctica Clínica, define al asma como una enfermedad crónica inflamatoria de las vías aéreas, en la que participan diversas células y mediadores químicos, cuyo desarrollo y expresión puede vincularse a diversos factores, tales como:

a) Inherentes: Genéticos, Obesidad, Género y b) Ambientales: Alérgenos (intra y extra domiciliarios), infecciones virales, tabaquismo pasivo y contaminación ambiental. [1]

Con respecto a los factores ambientales que contribuyen a la expresión del asma, un estudio realizado en algunos municipios del Estado de Puebla, demostró que existe una correlación inversa entre la incidencia de asma y el grado de marginación entre los municipios, resaltando que las condiciones de la vivienda influyen en el establecimiento de asma. Incluso hizo evidente que la falta de servicios de sanidad como el drenaje y la construcción de letrinas, inducen a la población a defecar al aire libre, lo cual podría estar vinculado a la exposición crónica con microorganismos presentes en la materia fecal (bacterias Gram negativas), desde la infancia hasta la edad adulta, lo cual se ha correlacionado con la generación de un efecto protector, que podría disminuir el riesgo de padecer asma. Así mismo este estudio indicó que los municipios con mejores servicios públicos, tales como; viviendas y urbanización, denotaron una mayor prevalencia de asma, posiblemente debido a la presencia de algunos factores ambientales, que inducen a la modulación positiva de la incidencia de asma, en contraste con aquellos municipios cuyas condiciones sanitarias deficientes, refieren a mayor grado de marginación; por lo cual existió una modulación

negativa en el desarrollo y expresión del asma bronquial, de acuerdo al número de casos reportados por Instituto Nacional de Estadística y Geografía e Informática (INEGI), en su reporte anual de 2010. [2]

Otros autores reportan que la exposición frecuente a factores presentes en el medio ambiente, como es el desarrollo de actividades agrícolas podrían estar vinculados a la protección contra el asma, pues parece correlacionarse estrechamente con la exposición al microcosmos de diversos microorganismos (hongos en el aire y la biodiversidad bacteriana).[3] Incluso es de importancia extrema el papel que desempeña el uso de antibióticos, ya que se reportó que su uso indiscriminado, en particular de manera excesiva durante el embarazo o el período neonatal, inducen cambios en la microbiota que han sido implicados el desarrollo de asma. [4]

La rinitis alérgica es definida según el CENETEC en su catálogo maestro de Guías de Práctica Clínica, como una enfermedad crónica inflamatoria de la mucosa nasal mediada por anticuerpos IgE alérgeno-específicos con participación de diversas células, citosinas y mediadores, cuyos síntomas principales desencadenados por la exposición a alérgenos, son la rinorrea, obstrucción nasal, prurito nasal y estornudos en salva, los cuales remiten espontáneamente o con tratamiento. Frecuentemente los pacientes con rinitis alérgica presentan síntomas conjuntivales y de asma.[5] Esta enfermedad es la primera causa de consulta en Alergología en muchos países incluyendo México. [6-9]

Para explicar este incremento de su prevalencia existen múltiples explicaciones, tales como la influencia de los factores genéticos, el estilo de vida y las condiciones del medio ambiente. [10, 11] Una de las teorías más relevantes es la llamada hipótesis higiénica, que postula que una forma natural de modular la respuesta inmunitaria es entrar en contacto con alérgenos y microorganismos (o partes de ellos) en etapas tempranas de la vida. [12, 13]

De manera interesante un estudio mostró que los niños que habían vivido en el campo o zona rural durante los primeros años de vida, presentaron una menor prevalencia de síntomas nasales en comparación con otros niños que no tuvieron esa experiencia. Los resultados demostraron que los niños que vivieron en zonas rurales disminuyeron sus probabilidades de presentar síntomas nasales o síntomas nasales y oculares. Lo cual fue consistente con informes de otros países, además se considera que el contacto con los animales domésticos (perros y gatos) y de corral (cerdos, vacas y caballos, entre otros) en los primeros años de vida puede favorecer el desarrollo temprano del sistema inmunitario de los niños al entrar en contacto con un espectro más amplio de antígenos.[14]

1.2 Asma y rinitis alérgica como problemas de salud

El asma y la rinitis suponen un problema de salud, son enfermedades muy comunes en todo el mundo, que afectan al menos del 10 al 30% de la población, y su prevalencia está aumentando.[15, 16]

Dentro de los factores desencadenantes de rinitis alérgica destacan: A) Neumoalérgenos: ácaros, animales domésticos, insectos, pólenes, mohos (*Alternaria spp, Cladosporium spp*) B) Contaminantes: Ozono, óxido nítrico, y el dióxido de azufre y Carbono) Medicamentos: Aspirina y otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES), que inhiben la síntesis de prostaglandinas. Frecuentemente los pacientes con rinitis alérgica presentan síntomas conjuntivales y de asma. [17, 18]

El asma ha sido definida por la Iniciativa Global para el Asma (GINA) como una enfermedad inflamatoria crónica de las vías aéreas en la que participan diversas células y

mediadores químicos; se acompaña de una mayor reactividad traqueo-bronquial (hiperreactividad de las vías aéreas), que provocan en forma recurrente tos, sibilancias, disnea y aumento del trabajo respiratorio, principalmente en la noche o en la madrugada. Estos episodios se asocian generalmente a una obstrucción extensa y variable del flujo aéreo que a menudo es reversible de forma espontánea o como respuesta al tratamiento. [19-24] Las causas que provocan el asma bronquial y que motivan la respuesta de los mecanismos antes referidos se clasifican en: *A) Extrínsecas*: Antecedentes familiares positivos para alergias y se asocia con una hipersensibilidad de tipo 1 y otras manifestaciones alérgicas, inducidas por agentes alérgenos como el polen, lana, polvo, o contaminación atmosférica, materias irritantes, variaciones meteorológicas, aspergilosis y otros.[25-32] *B) Intrínsecas o idiopática:* Comienza en mayores de 35 años y sin antecedentes personales ni familiares. Se inicia por estímulos no inmunológicos, sin elevar IgE, representados por bacterias (*Chlamydophila pneumoniae; Mycoplasma spp*) hongos, tos, trastornos psíquicos, estrés, etc. [33-37] *C) Mixtas:* Combinación con frecuencia de naturaleza bacteriana de factores intrínsecos y extrínsecos.[37] Las exacerbaciones asmáticas están vinculadas con mayor frecuencia a la presencia de virus y bacterias como *M. pneumoniae* y *M. fermentans* sin embargo, se desconoce si *Mycoplasma spp* participa en la fisiopatología de la rinitis alérgica. En la República Mexicana estudios realizados mediante cuestionarios estandarizados en escolares de varias ciudades mexicanas se observó una prevalencia del asma de 4.5%. El Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) durante 2006 otorgó 600,000 consultas por asma y dio atención hospitalaria a casi 270,000 casos de exacerbaciones de asma. Al mismo tiempo la rinitis alérgica se consideró como la primera causa de consulta en alergología en muchos países incluyendo México, y una de las diez principales en atención primaria. [9, 17, 21, 23] Por todo lo anterior se concluye que tanto la

rinitis alérgica como el asma han aumentado su prevalencia; y son una importante causa de hospitalización en grupos de edad vulnerables, afectando la economía familiar y barriendo con los recursos de las instituciones. De esto se deduce el hecho de que un mejor entendimiento de ambas enfermedades y su posible connotación microbiológica en particular la posible relación con las especies de *Mycoplasma* mejoraría su pronóstico.

1.3 Clasificación taxonómica de los micoplasmas

Las bacterias denominadas como micoplasmas cuyo significado es «forma de hongo», están clasificadas en la clase *Mollicutes* (*Mollis* = suave; cutis = piel). Esta clase está compuesta por cuatro órdenes, cinco familias y ocho géneros, de los cuales se conocen 183 especies. Dentro de estas especies, 16 se han aislado de humanos (Figura 1), siendo reconocidas las siguientes especies del género *Mycoplasma* como patógenos: *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis* y *Mycoplasma genitalium,* y a los *Ureaplasmas;* en el caso de *Mycoplasma fermentans,* también es reconocido como un patógeno, pero oportunista en sujetos infectados con virus de inmuno deficiencia adquirida (VIH), también se ha asociado a este micoplasma con artritis crónica. [38, 39]

Estudios recientes permitieron la identificación de un nuevo micoplasma denominado *Mycoplasma amphoriforme*, en secreciones del tracto respiratorio, así como en individuos inmunocomprometidos con bronquitis crónica, y *Mycoplasma pirum.*[40]

Existen numerosas especies de micoplasmas que se encuentran como flora normal en personas sanas, por lo que la asociación de éstos con la enfermedad hace difícil el diagnóstico.[40]

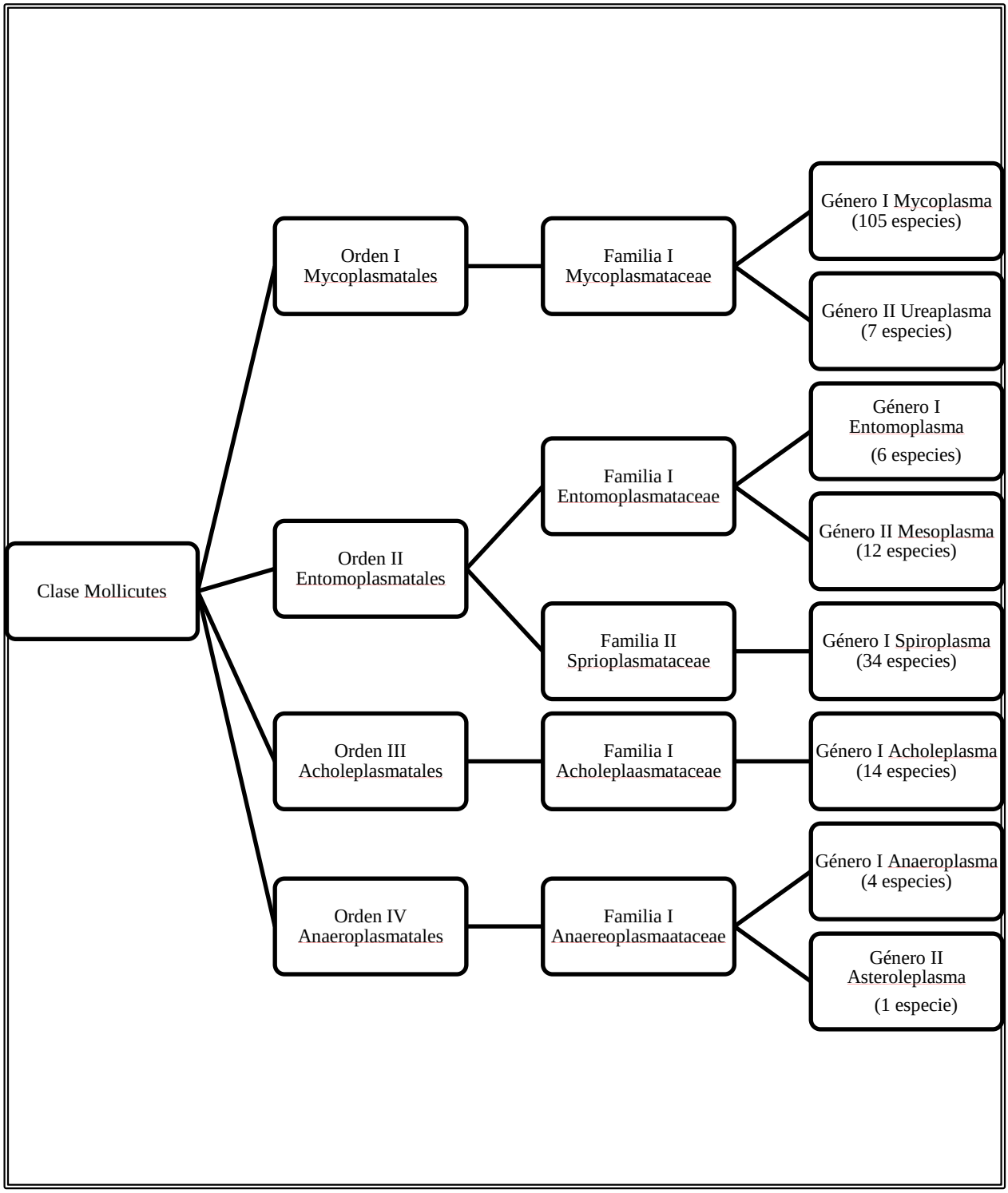


Figura 1. **Clasificación taxonómica de la clase Mollicutes, en donde se observan los cuatro órdenes en los que se divide la clase Mollicutes y los Géneros que incluyen a las 183 especies reportadas. Elaboración propia 2013.**

1.4 Características microbiológicas de los micoplasmas

Los micoplasmas son considerados los microorganismos autoreplicativos más pequeños, carecen de pared celular, por lo cual resultan ser insensibles a los antibióticos betalactámicos, tampoco se tiñen por la técnica de Gram, otra característica es su pleomorfismo derivado de la ausencia de pared celular, su sensibilidad a los detergentes, a los solventes orgánicos y a los cambios en la osmolaridad del medio.[38, 39]

La ausencia de la pared celular y el contenido de esteroles en su membrana, así como una red de proteínas internas les confiere una forma similar a un citoesqueleto. Este organelo participa en la formación del órgano de fijación, además de ayudarle a mantener la forma, la membrana celular de estos microorganismos es parecida a la membrana externa de las bacterias Gram negativas, con una capa interna fosfolipídica y una capa externa de lipoproteínas (Figura 2).

Los micoplasmas pueden cultivarse en medios sólidos y líquidos sofisticados, requieren de medios especiales que contengan esteroles y vitamina E, precursores de ácidos nucleicos y suero, donde se puede observar la forma de las colonias como células pequeñas con apariencia de huevo frito, debido a su crecimiento central dentro del medio; a su alrededor crecen dando lugar a un halo periférico más delgado. Para poder observar el crecimiento de las colonias es necesario utilizar el microscopio. En medios líquidos se desarrolla en forma filamentosa o pleomórfica. La diferenciación de las especies de micoplasmas se realiza de acuerdo a las características metabólicas de cada una.

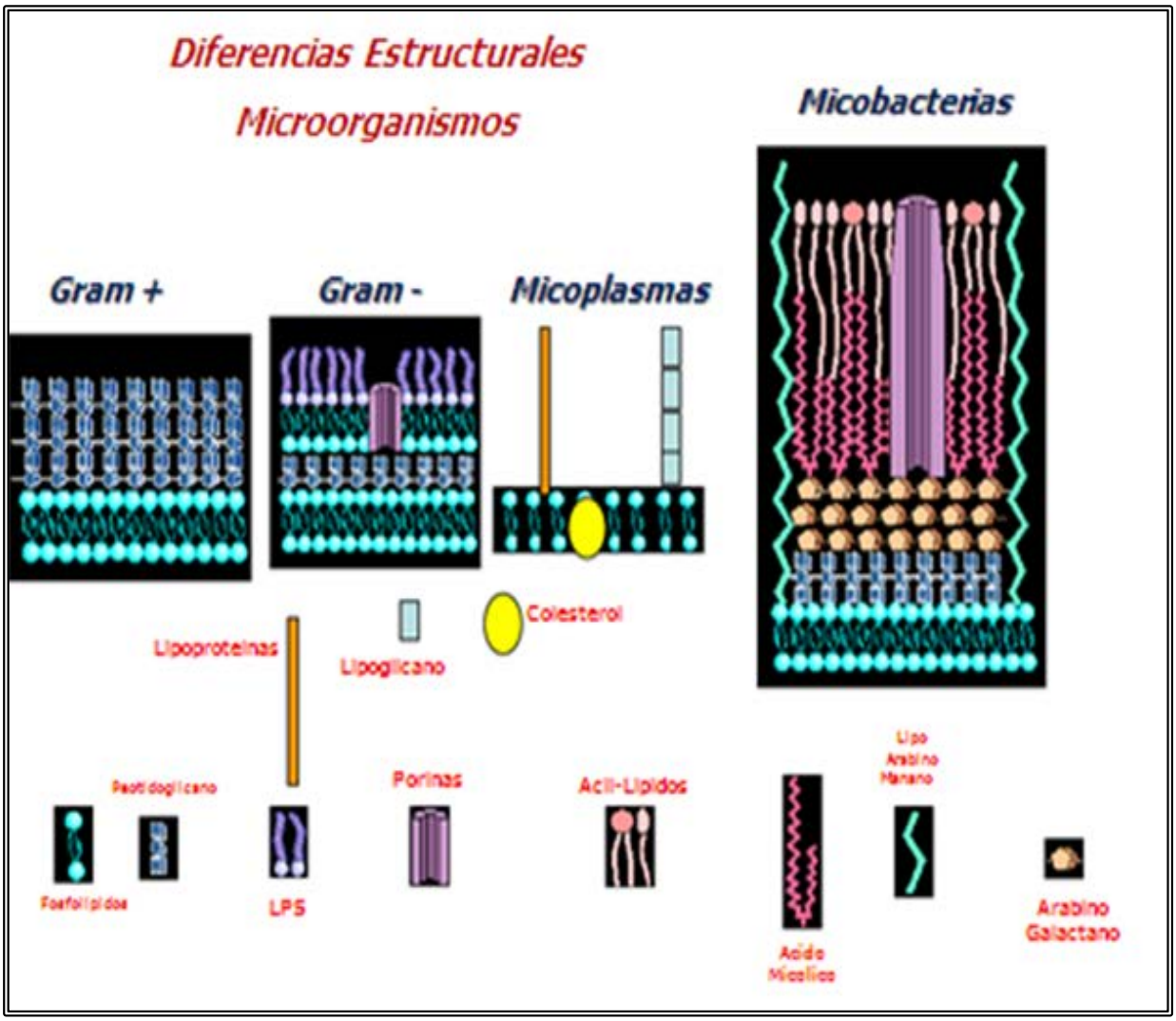


Figura 2. **Comparación de la estructura membranal entre bacterias Gram negativas, positivas y micoplasmas. Se observan los componentes de las membranas de Bacterias Gram Negativas y Positivas con respecto a los Micoplasmas.**
Elaboración propia 2010.

Debido a que los micoplasmas pueden crecer en forma simbiótica y mantener una interacción íntima con las células de los mamíferos durante largos periodos, podrían desencadenar una cascada de señales de la membrana celular al medio, alterando la función de muchos genes. [40]

Algunas de las propiedades microbiológicas de los micoplasmas que han sido implicados como determinantes de virulencia son que establecen una 1) competencia por el consumo de nutrientes, lo que podría alterar la función y mantenimiento del huésped; 2) existencia de capas o estructuras de material pseudocapsular y superficie densa en electrones, que incrementa la integridad de la superficie micoplásmica y le confiere propiedades inmunoreguladoras; 3) variación antigénica y de fase de alta frecuencia, que determina la diversidad de superficie y posiblemente evite las defensas inmunes del huésped; 4) secreción o introducción de enzimas micoplásmicas, como fosfolipasas, ATPasas, hemolisinas, proteasas y nucleasas en el ambiente celular del huésped, que conduce a una alteración tisular localizada, así como desorganización y aberraciones cromosómicas; y 5) alojamiento intracelular, que a través del secuestro de micoplasmas, establece estados crónicos o latentes, y evade mecanismos inmunes micoplasmicidas y farmacoterapias selectivas. [41]

1.5 Micoplasmas aislados en el ser humano y sus factores de virulencia

La mayoría de los micoplasmas viven como comensales en el tracto respiratorio y urogenital del humano, representando el concepto de parásito que vive en armonía con el huésped. [38-45]

Los micoplasmas patógenos del humano se pueden clasificar de acuerdo a si fermentan glucosa, utilizan arginina o hidrolizan la urea (Tabla 1).[46]

***Tabla 1*. Micoplasmas de interés médico, sitio anatómico primario de colonización y sustrato metabólico que requieren.**

	Sitio primario de colonización		Sustrato metabólico		
Especie	Orofaringe	Tracto genitourinario	Glucosa	Arginina	Urea
M. salivarium	+	-	-	+	-
M. orale	+	-	-	+	-
M. buccale	+	-	-	+	-
M. faucium	+	-	-	+	-
M. lipophilum	+	-	-	+	-
M. pneumoniae	+	-	+	-	-
M. hominis	+	+	-	+	-
M. spermatophilum	-	+	-	+	-
M. genitalium	+	+	+	-	-
M. fermentans	+	+	+	+	-
M. penetrans	-	+	+	+	-
Ureaplasma urealyticum	+	+	-	-	-

Tomado de Rivera-Tapia JA, Cedillo-Ramírez ML, Vega-Benítez M. Micoplasmas y su importancia médica. Rev Biomed. 2001; p: 265.

El contacto íntimo de los micoplasmas con las membranas celulares del huésped, puede provocar la fusión local entre las dos membranas o el intercambio de componentes de membrana y con ello la inyección directa de su contenido citoplásmico, así sus potentes nucleasas combinadas con los radicales superóxidos, pueden causar un efecto clastogénico con alteraciones cromosómicas, morfológicas y transformaciones celulares en los cultivos celulares; este efecto se ha observado en *Mycoplasma penetrans* como cofactor en la inducción del sarcoma de Kaposi asociado al Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida (SIDA). [44, 45]

La adhesión es un requisito esencial para la colonización e infección. Las adhesinas mejor conocidas son las de *M. pneumoniae* y *M. genitalium* como la P1, MgPa y P30. [39] Las

adhesinas interaccionan con los receptores de las membranas celulares, corresponden a proteínas sialoconjugadas, glucolípidos sulfatados o proteínas modificadas por lípidos.

La capacidad de los micoplasmas de fijarse a las células ciliadas del aparato respiratorio evita el movimiento de los cilios, los cuales son de importancia vital para la defensa de las vías respiratorias. *M. hominis*, además posee otra proteína en su superficie denominada Vaa, la cual está codificada por 6 tipos de genes diferentes. La expresión de estos genes, los cuales pueden apagarse o encenderse, es una habilidad que podría ayudar a la bacteria a diseminarse de una célula a otra.[32] Otro factor de virulencia, es el metabolismo de la arginina, se ha sugerido que *M. hominis* genera energía en forma de ATP por hidrólisis de este aminoácido, un proceso que utiliza la vía de tres enzimas, cuyo producto final es CO_2 y NH^3, tóxico para las células del huésped. [39]

Los ureaplasmas producen una enzima ureasa que induce la cristalización de estruvita y fosfato de calcio en la orina en estudios «*in vitro*» y formación de piedras en modelos animales. Además se han encontrado ureaplasmas en los cálculos urinarios de pacientes con infecciones con este tipo de piedras. [44] Otro factor de virulencia de los ureaplasmas son tres fosfolipasas A1, A2 y C, las cuales inducen la labor de parto prematuro a través de la liberación de ácido araquidónico, alterando la síntesis de las prostaglandinas. [39, 44] Este evento se demostró en estudios realizados en modelos animales, cuyos resultados mostraron que los ureaplasmas pueden causar una disminución importante de las prostaglandinas E2 y F2, debido a la actividad de la fosfolipasa A2, que induce la liberación de cantidades excesivas de ácido araquidónico, inhibiendo la síntesis de prostaglandinas. [44] También se ha observado que *U. urealyticum* induce la producción de citocinas inflamatorias como el TNFα, interleucina 6 (IL-6), tanto en el humano como en líneas celulares de macrófagos de rata, además induce la liberación de óxido nítrico en cultivo de macrófagos alveolares. [33]

Las especies de *M. fermentans, M. penetrans,* y *M. pirum*, se han asociado a enfermedades tanto en sujetos sanos como con pacientes con VIH. [38]

Los micoplasmas asociados al VIH utilizan glucosa e hidrolizan la arginina en los macrófagos infectados, a través de una arginina desaminasa, la cual inhibe el factor citotóxico de los macrófagos. Estos micoplasmas también liberan nucleasas en el medio, los cuales degradan a los ácidos nucleicos del huésped. Además, *M. fermentans*, *M. penetrans* y *M. pirum*, tienen la capacidad de invadir las células del huésped y vivir como patógenos intracelulares. [40] Otro micoplasma de interés médico es *M. pneumoniae,* el cual es una bacteria simple con respecto a la composición de su envoltura celular, su capacidad biosintética y reguladora, el tamaño de su genoma, además de poseer un organelo terminal complejo multifuncional, integrado por un nucleoide electro denso, ligado a una estructura parecida a un citoesqueleto, con una extensión unido a la membrana celular constituida por un par de filamentos orientados longitudinalmente, con los que se adhieren a las células eucariotas.[43, 44] El órgano terminal está constituido por proteínas que actúan como adhesinas de superficie, tales como la proteína P1 y P30, así como proteínas accesorias denominadas HMW1, HMW2, A, B y C que contribuyen en la distribución y disposición adecuada de las adhesinas. Con el organelo terminal, los micoplasmas realizan movimientos de reptación sobre las superficies celulares, en el que participan proteínas similares a la actina ligadas a fibrillas.

1.6 Relación de los micoplasmas con el asama y las enfermedades respiratorias

Mycoplasma pneumoniae, fue el primer micoplasma reportado como patógeno del ser humano. Es el causante de la neumonía adquirida en la comunidad, en aproximadamente 20% de la población general y el 50% en grupos confinados. Se ha asociado a *M. pneumoniae* con el desarrollo de neumonías en niños en edad escolar, adolescentes y adultos jóvenes.[47, 48] Los estudios serológicos realizados en diferentes países han mostrado que *M. pneumoniae* presenta un patrón de infecciones cíclicas con enfermedades endémicas puntuadas por epidémicas, presentándose cada 3 a 5 años, en personas mayores, así como en niños menores de 5 años.[49, 50] El principal síntoma clínico es la traqueobronquitis, que se desarrolla en un tercio de las personas infectadas. El periodo de incubación es de 2-3 semanas, se disemina a través de las amas de casa. Esta bacteria puede persistir en el tracto respiratorio por meses después de una infección previa, algunas veces por años en pacientes hipogammaglobulinémicos, posiblemente porque la bacteria se adhiere fuertemente a las células epiteliales a través de la proteína P1 que funciona como adhesina.[49, 50] La enfermedad no es de tipo estacional, las infecciones son subclínicas, siendo las más comunes y benignas en el humano. Sin embargo, las infecciones severas requieren de hospitalización, sobre todo en sujetos de edad media a mayores. Además, *M. pneumoniae* induce un gran número de mediadores inflamatorios implicados en la patogénesis del asma, por lo que se cree que este micoplasma juega un papel importante en la exacerbación de la misma, incluyendo jadeos frecuentes.[36, 49]

1.7 Muestras biológicas para aislamiento de Micoplasmas en laboratorio

Las muestras para el cultivo de los micoplasmas pueden ser: sangre, líquido sinovial, líquido amniótico, líquido cerebroespinal, orina, secreciones prostáticas, semen, esputo, aspirado bronquial, exudado nasofaríngeo, exudados de cérvix y/o vaginal y uretra, de heridas, biopsia de tejidos de autopsias incluyendo placenta, endometrio, cálculos urinarios. [46] Éstas deben tomarse con gran cuidado para evitar la contaminación, los hisopos utilizados para la toma deben de ser de alginato de calcio, dacrón o poliéster con aluminio o de plástico. También pueden aislarse de la sangre, inoculando sangre libre de anticoagulantes dentro de un medio líquido específico para estas bacterias en relación 1:10, estas bacterias son inhibidas por el anticoagulante usado comercialmente en paquetes de sangre, sin embargo el efecto inhibitorio puede evitarse añadiéndole gelatina al 1% P/V. [40] Aunque los medios de cultivo están bien adaptados para algunas especies, las cuales pueden ser aisladas fácil y rápidamente como *M. hominis* y *Ureaplasma*, existen otras especies, que para su detección son consideradas fastidiosas o de crecimiento lento como *M. genitalium*; su crecimiento puede observarse al mes y *M. pneumoniae* que tarda al menos ocho días para poder observar las colonias. [51]

1.8 Características genéticas de los micoplasmas

El genoma de los micoplasmas, está compuesto aproximadamente de 600 a 2300 kb [41], como se puede observar en la Tabla 2, lo que explica su capacidad biosintética limitada, fundamentalmente para la biosíntesis de aminoácidos y vitaminas, además de explicar su existencia saprófita o parásita, así como su sensibilidad al medio ambiente. [2, 42] Por ejemplo, *M. pneumoniae* posee un genoma de 816 kb, por lo cual el pequeño tamaño de su

genoma impone requerimientos nutricionales complejos, así como la dependencia de fuentes externas de precursores biosintéticos tales como aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos y esteroles. Los micoplasmas evolucionaron a través del tiempo a partir de bacterias Gram-positivas con genomas promedio de 2500-2700 kb. [52]

El ácido desoxirribonucleico (ADN) micoplásmico está compuesto por un bajo contenido de dominios guanina-citosina, a semejanza de sus ancestrales bacterias Gram positivas. Presentan además diferencias en la composición de sus codones, resaltando el uso del codón TGA para codificar el triptófano a una frecuencia 10 veces mayor a la usual. [53]

Los micoplasmas evolucionaron a partir de bacterias; en especial de una rama del árbol filogenético que contenía bacterias Gram positivas con ADN bajo en contenido guanina - citosina [52], por lo cual comparten entonces un ancestro común con los bacilos, clostridios, enterococos, lactobacilos, estafilococos y estreptococos; de este modo las señales de expresión génica y muchos otros aspectos de la biología molecular del micoplasma serían similares a los de aquellas bacterias Gram-positivas. [41]

Se ha relacionado al tamaño pequeño de los micolasmas con la dependencia de un hospedero, ya que en el caso de *Mycoplasma pneumoniae* su genoma de 816 kb sugiere que su forma de vida es probablemente más cercana a los parásitos celulares obligados que a los organismos de vida libre. Esto ha llevado a suponer que la reducción del número de genes claramente expresa la dependencia de un genoma huésped; además, de que la pérdida de secuencias de codificación, ha sido considerada como consecuencia de una estadía intracelular prolongada.[41]

***Tabla 2*. Propiedades de los mollicutes representativos.**

Organismo	Tamaño del genoma (kb)	Hábitat	Grupo filogenético
Acholeplasma			
Laidlawii	1600	Animales	Acholeplasma
Oculi	1600	Animales	Acholeplasma
Anaeroplasma spp.	1600	Animales	Acholeplasma
Asteroleplasma			
Anaerobium	1700	cerdo	Asteroleplasma
Entomoplasma			
ellychniae	900	Insectos	Mycoides
Mesoplasma			
Florum	1600	Plantas	Mycoides
Lactucae	900	¿Plantas?	Mycoides
Mycoplasma			
Arthritidis	840	Roedores	Hominis
Bovis	1100	Vaca	Fermentans
Capricolum	110	Cabra	Mycoides
Fermentans	1160	Humano	Fermentans
Flocculare	1200	Cerdo	Hyorhinis
Gallisepticum	100	Aves	Pneumoniae
Genitalium	580	Humano	Pneumoniae
Hominis	700	Humano	Hominis
Hyopneumoniae	1100	Cerdo	Hyorhinis
Hyorhinis	820	Cerdo	Hyorhinis
Iowae	1300	Aves	Pneumoniae
Mobile	780	Peces	Hyorhinis
Mycoides	1300	Vaca, Cabra	Mycoides
Pneumoniae	816	Humani	Pneumoniae
Pulmonis	950	Roedores	Fermentans
Salivarium	900	Humano	Hominis
Spiroplasma			
Citri	1400-1800	Plantas, Insectos	Spiroplasma
Ureaplasma			
Urealyticum	800-900	Humano	Pneumoniae

Tomado de: Carreazo- Pariasca J. Fisiopatología de las infecciones por *Mycoplasma pneumoniae.* Pathophysiology of *Mycoplasma pneumoniae* infections. Paediatrica 2003; 5(2) p: 105.

1.9 Caracterización molecular de los micoplasmas

Actualmente se han desarrollado métodos alternativos para detección de los micoplasmas, tales como la detección de antígenos, los cuales son métodos rápidos de realizar, sirven para detectar antígenos de *M. pneumoniae*, a través de técnicas de inmunofluorescencia directa, contrainmunoelectroforesis, inmunoblotting y Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA); sin embargo, estas técnicas son poco sensibles, además de producir reactividad cruzada con otros micoplasmas que se encuentran en el tracto respiratorio.[54, 55] Otro método de detección es el uso de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual se ha desarrollado para todos los micoplasmas clínicamente importantes que infectan al humano. Las células diana incluyen los genes de 16S rRNA y otras secuencias repetitivas como los elementos de inserción *de M. fermentans*.[55]

Considerando que *M. pneumoniae* presenta un crecimiento lento en medio de cultivo, y a que existen especies que son extremadamente fastidiosas, para las cuales los cultivos no están bien establecidos como es el caso de *M. genitalium* y *M. fermentans*; el uso de la técnica de PCR puede representar un medio práctico para detectar su presencia en muestras clínicas, dónde además su sensibilidad es muy alta. Sin embargo, comparando la técnica de PCR y el cultivo y/o serología en el caso de *M. pneumoniae*, han conducido a una variedad de resultados, por lo que aún está limitada para estas bacterias. Actualmente la técnica de PCR para la detección de micoplasmas y otros microorganismos de importancia clínica es todavía costosa y compleja para realizarla en forma rutinaria en la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica.[56, 57]

2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente el asma y la rinitis alérgica son consideradas dentro de los principales problemas de salud en el área de Servicio de Alergia de diversos hospitales. Se estima que los costos por el tratamiento de estas enfermedades son elevados, por lo cual representan un desbalance en la economía familiar; cuyo precio puede incrementar considerablemente durante el curso de una exacerbación o crisis. Las exacerbaciones del asma y la rinitis alérgica se han asociado a diversos factores, siendo el aspecto ambiental un elemento transcendental; ya que la distribución de los ecosistemas y la presencia de ciertos alérgenos en el Estado de Puebla es muy heterogénea, además; debido al cambio climático se ha modificado el equilibrio entre los factores bióticos y abióticos, lo que puede contribuir a desencadenar la agudización de ambas patologías. Otros factores coadyuvantes son los genéticos, el estilo de vida del paciente (socioeconómicos y estado nutricional).

Algunos estudios plantean que la presencia de la bacteria *Mycoplasma spp,* esta relacionada a diversas patologías en el hombre y recientemente se le ha asociado a enfermedades del tracto respiratorio, sin embargo la información existe con respecto a su aislamiento en pacientes con asma o rinitis alérgica es escasa. Por lo anterior expuesto se denota que tanto el asma como la rinitis alérgica representan problemas de salud, que ocasionan pérdidas en la economía familiar y que pueden agravarse por ciertas condiciones ambientales, por lo cual es de suma importancia el realizar el aislamiento de *Mycoplasma spp* en pacientes con asma o rinitis alérgica y evaluar su sensibilización alérgica como resultado de la exposición a alérgenos ambientales; con la finalidad de replantear la influencia del aspecto ambiental y la presencia de *Mycoplasma spp* en las exacerbaciones del asma y la rinitis alérgica.

3. HIPOTESIS

Considerando que el asma y la rinitis alérgica son enfermedades cuya prevalencia y exacerbaciones se pueden agudizar, por la distribución geográfica de los factores ambientales en el Estado de Puebla, tales como, vegetación, flora, fauna y la infección por ciertos microorganismos; es posible que algunos de los pacientes que acuden al servicio de alergia del HUP y que además cursan con exacerbaciones de estas dos enfermedades, puedan encontrarse infectados con *Mycoplasma spp*.

La presencia de estas bacterias en los pacientes podría influir en sus exacerbaciones, debido quizás a que estos agentes microbiológicos estimulen la respuesta inmunológica que participa en este proceso, por lo cual podrían incrementar la sensibilidad de estos pacientes a diversos alérgenos presentes en el ambiente de manera natural.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Aislar e identificar *Mycoplasma spp* en muestras de pacientes que padecen una exacerbación de rinitis alérgica o asma, así analizar la relación existente entre el aislamiento de *Mycoplasma spp* y la susceptibilidad a extractos de alérgenos ambientales, con la finalidad de replantear la influencia del aspecto ambiental y la presencia de *Mycoplasma spp* en las exacerbaciones de estas enfermedades.

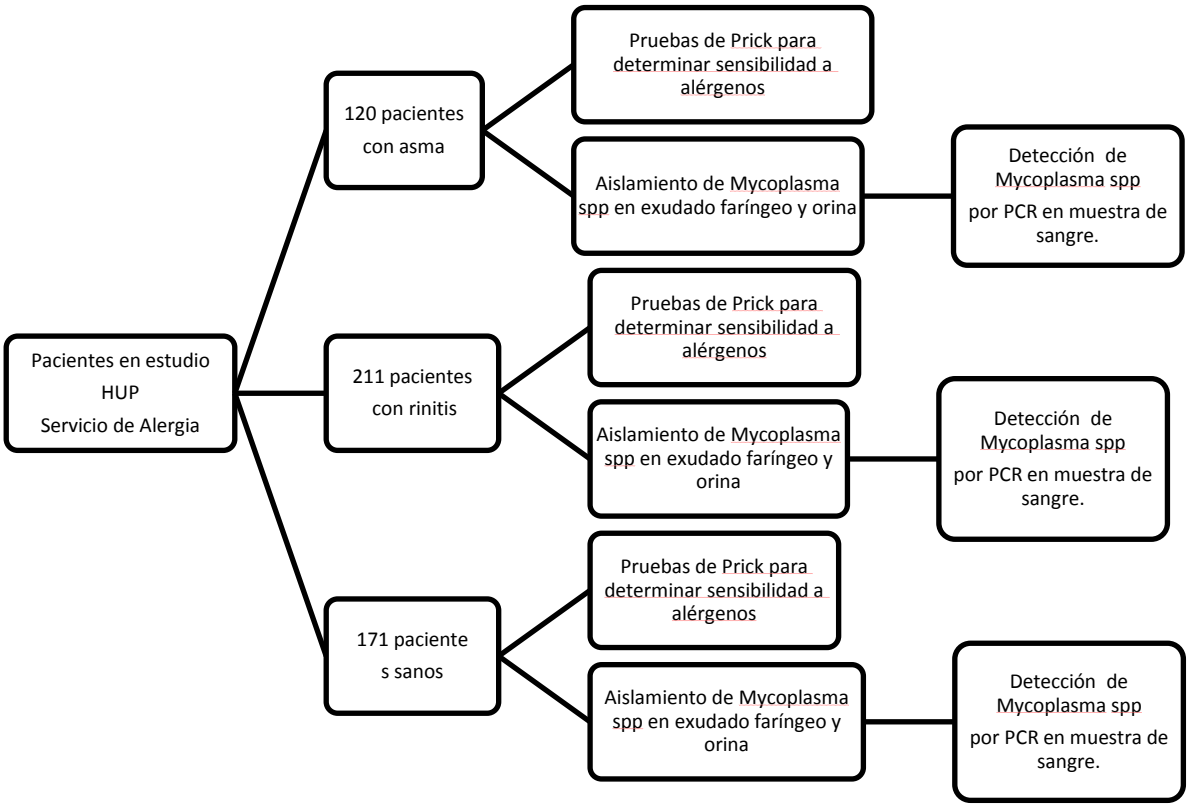
4.2 Objetivos específicos

I) Aislar *Mycoplasma spp* en muestras de exudado faríngeo y orina de pacientes con asma ó rinitis alérgica.

II) Realizar pruebas cutáneas de Prick de susceptibilidad a alérgenos ambientales en pacientes que resultaron positivos al aislamiento de *Mycoplasma spp.*

III) Analizar la relación existente entre el aislamiento de *Mycoplasma spp*, la susceptibilidad a extractos de alérgenos ambientales y las exacerbaciones del asma y la rinitis alérgica.

5. ESQUEMA DE TRABAJO



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Diseño del Estudio

El presente estudio fue de tipo: descriptivo observacional, transversal, homodémico unicéntrico, prospectivo. Se realizó en el Hospital Universitario de Puebla en el área de servicio de alergia. La población de estudio fueron pacientes con asma o rinitis alérgica.

Criterios de Selección: Se incluyeron todos los pacientes que acudieron al servicio de Alergia del Hospital Universitario de Puebla (HUP).

a) ***Criterios de Inclusión:*** Se consideraron todos los pacientes con diagnóstico de asma o rinitis alérgica del servicio de alergia del HUP con expediente clínico completo, incluyendo pruebas cutáneas de Prick y que cursaran con exacerbaciones al momento de la toma de muestra.

b) ***Controles:*** Familiares sanos de los pacientes con las enfermedades anteriormente referidas.

c) **Criterios de Exclusión*:*** Todos los pacientes que no tengan diagnóstico de asma o rinitis alérgica.

d) **Criterios de Eliminación:** Todos los pacientes con diagnóstico de asma o rinitis alérgica que no desearon participar o con expediente clínico incompleto ó sin exacerbaciones al momento de la toma de muestra.

6.2 Diagnóstico de pacientes con rinitis alérgica y asma.

Los pacientes fueron diagnosticados con asma de acuerdo a la sintomatología descrita en las guías de práctica clínica diagnóstico y tratamiento del asma (Guía de referencia rápida S009-08. CENETEC, 2013). [1]

En el caso de los pacientes con rinitis alérgica fueron diagnosticados de acuerdo a la sintomatología descrita en las guías de práctica clínica diagnóstico y tratamiento de rinitis alérgica (CENETEC, 2009). [5]

6.3 Método de Recolección de muestras

Se recolectaron muestras de exudado faríngeo y orina de 120 pacientes asmáticos, 211 con rinitis alérgica, así como de 171 pacientes sanos para estas enfermedades, para el cultivo de *Mycoplasma spp* Todas las muestras fueron tomadas con hisopos estériles y se colocaron en tubos de ensayo, se adicionaron 2 mL de caldo tripticasa soya y 0.5 de albumina bovina, se les aplicó penicilina para inhibir el crecimiento microbiano de algunas bacterias Gram negativas y Gram Positivas. Este medio de cultivo contenía fuente de esteroles y precursores preformados de ácidos nucleicos, las muestras se incubaron a 37 ^{o}C. Posteriormente se inocularon en medios líquidos y sólidos para su caracterización al microscopio, la cual consistió en la observación de la morfología colonial típica de las bacterias en forma de huevo frito.

6.4 Criterios éticos del estudio

Para llevar a cabo esta investigación se tomó en cuenta en todo el tiempo el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud; Titulo

Segundo; De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos; Capitulo I; Articulo 17; Categoría II Investigación con riesgo mínimo.[58]

Todos los pacientes y grupo control firmaron un formulario de consentimiento informado y el protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario de Puebla. Los pacientes y los controles eran residentes en el Estado de Puebla, México, y se consideran demográficamente como pertenecientes al grupo étnico mestizo. Familiares sanos de los pacientes (171), fueron considerados como el grupo control.

6.5 Aislamiento microbiológico de *Mycoplasma spp* a partir de muestras de exudado faríngeo y orina.

El medio que se utilizó para el aislamiento de *Mycoplasma spp* fue el caldo Eaton (Medio E), el cual se preparó de la siguiente manera 65 mL de agua destilada, 2 g de base para micoplasmas Becton Dickinson, 0.5 g de dextrosa, 1 mL de rojo de fenol al 0.4%, 25 mL de suero de caballo *Hy Clone*, 10 mL de dializado de levadura. Para el agar Eaton se adicionó 1.3 g de agar bacteriológico. Se realizó la siembra directa de muestras de exudado faríngeo y orina en medios Eaton (media E), con penicilina, el medio contenía como indicador rojo fenol, el cual cambió de color, en caso positivo de crecimiento de la bacteria estudiada, las muestras sembradas de exudado faríngeo fueron reportados como negativos cuando no pudieron cambiar el color del indicador de pH después de 30 días de incubación, las cajas Petri fueron incubadas a 37 ºC, en condiciones aeróbicas, transcurridos pocos días se observó el desarrollo de colonias de morfología pequeña, las cuales se examinaron al microscopio a los 2, 5, 10, 15 y 21 días. [39, 46]

6.6 Detección de *Mycoplasma spp* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para la detección mediante PCR de colonias bacterianas pertenecientes al género *Mycoplasma spp*, se obtuvieron muestras de ADN mediante el protocolo de extracción con fenol y cloroformo a partir de cultivos positivos para el crecimiento de *Mycoplasma spp*. Los cebadores de oligonucleótidos utilizados para la detección por PCR fueron: a) AR1: 5 YB ' ATG RGG RTG CGG CGT ATT AG 3 ') AR2: 5 ' CKG CTG GCA AGT CAT TAG CCRT 3 ', (donde K representa una mezcla de nucleótidos G_T y R contiene AG), dichos oligonucleótidos amplifican para una secuencia del gen ARNr 16S específico de 301pb de nucleótidos de una secuencia, la cual existe en el genoma de 30 especies de micoplasmas. [59] Cabe mencionar que previamente se confirmó la especificidad de estos cebadores para la detección de *Mycoplasma spp*. La mezcla de reacción para PCR contenía: 50 mM de KCl , 1.5 mM de MgCl2 , 10 mM de Tris - HCl (pH 8.3), 0.2 mM de cada trifosfato de desoxinucleótido , 6 M de cada cebador y 1 unidad de AmpliTaq ® (Perkin Elmer Cetus , Emer - Ville , CA .) y 5 µL del ADN de la muestra analizar, el cual fue adicionado al final, el volumen total de la reacción fue de 50 µL . Para el control positivo se utilizó un lisado diluido de *M. fermentans* PG – 18 (ATCC 19989), correspondiente a 100 CCU y como control negativo se empleó agua estéril. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 40 ciclos, el paso de desnaturalización fue a una temperatura de 95 °C durante 25 s, el de alineamiento a 60 °C durante 60 s y extensión a 72 °C durante 60 s. Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %, el gel fue teñido con bromuro de etidio durante 5 minutos y se visualizaron por luz UV.

6.7 Prueba cutánea de Prick en pacientes para la determinación de su sensibilidad ante extractos de alérgenos ambientales.

La técnica se realizó de la siguiente manera: en la cara flexora de ambos antebrazos del paciente, se desinfectó con alcohol la piel. Se le explicó al paciente el procedimiento, ya que se requiere de la colaboración adecuada, para llevar a cabo una correcta evaluación. Se considero durante el procedimiento que no existieran lesiones de otro origen en la piel. Se marcaron círculos en la piel con el número de extractos de alérgenos a estudiar, más un círculo para el control positivo, que fue una solución de histamina y otro para el control negativo utilizado en esta prueba agua PISA inyectable estéril. La lista de extractos de alérgenos ambientales evaluados fueron 16, que incluyeron tres categorías: extractos de alérgenos intradomiciliarios, forestales y de tipo maleza. Sobre la gota de reactivo (que contiene el extracto del antígeno), se hizo una punción de 1mm, con el objetivo de asegurar la penetración a la epidermis. Posteriormente se esperaron 15 minutos, para medir el halo de la reacción en cada sitio. Se consideró positiva la reacción de sensibilidad ante los extractos de alérgenos probados cuando resulto ser 3 mm mayor al control negativo.[60] El procedimiento empleado se resume en la figura 3.

Los extractos de alérgenos ambientales de tipo intradomiciliario probados en la presente investigación fueron 4, el extracto de ácaro (*Dermatophagoides farinae*), cucaracha (*Periplaneta americana*), pelo de perro (*Canis familiaris*); y de gato (*Felis domesticus*), se probaron 7 extractos de alérgenos de tipo forestal que incluyeron al eucalipto (*Eucalyptus globulus*), pino (*Pinus spp*), encino (*Quercus spp),* pirul (*Schinu spp*), sauce (*Salix babylonica*), álamo (*Populus spp*) y trueno (*Ligustrum spp*), y por último se examinó la reacción ante 5 extractos de alérgenos de tipo maleza, que fueron el girasol (*Helianthus*

annus), lengua de vaca (*Rumex crispus*), pasto (*Cynodon dactylon*), cardo (*Silybum marianum*) y epazote (*Chenopodium Ambrosioides*).

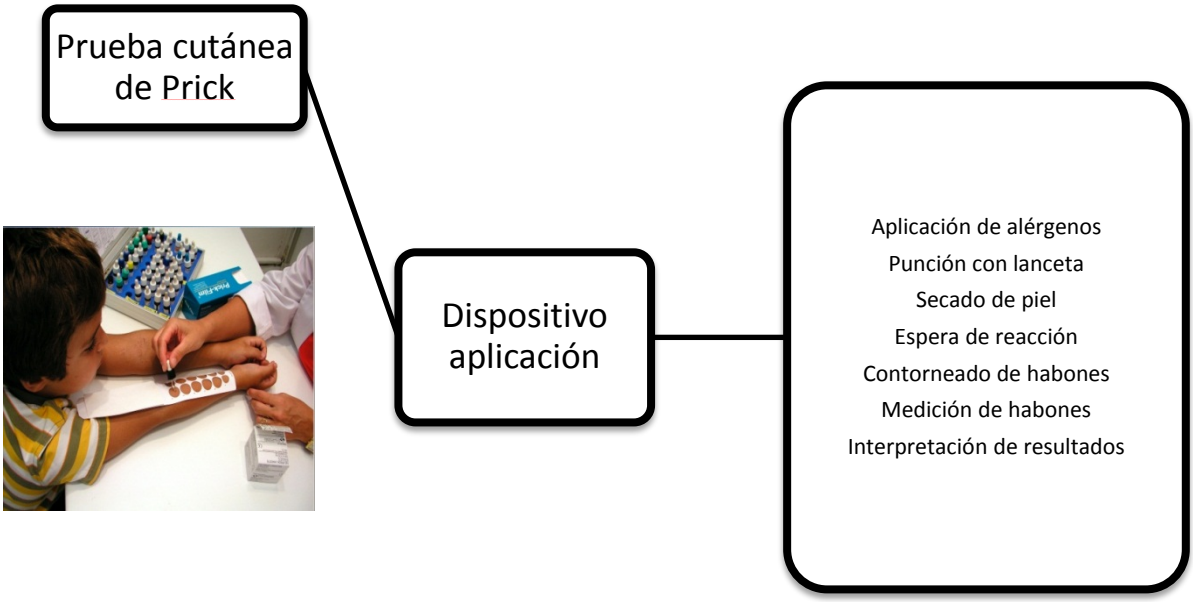


Figura 3. Esquema del procedimiento de la Prueba de Prick. Este se realiza sobre la piel del paciente con objeto de determinar los alérgenos ambientales que pueden desencadenar una reacción de hipersensibilidad inmunológica alergénica.
Elaboración propia, 2013.

7. RESULTADOS

7.1 Aislamiento de *Mycoplasma spp* en pacientes asmáticos y con rinitis alérgica en muestras de exudado faríngeo y orina.

Debido a que en diversos estudios se ha relacionado a la presencia de *Mycoplasma spp* en exacerbaciones de enfermedades del sistema respiratorio, tales como el asma y la rinitis alérgica, en el presente se procedió a identificar *Mycoplasma spp* en muestras de exudado faríngeo (EF) y orina (O), en 120 pacientes asmáticos, de los cuales 54 pertenecieron al género masculino y 66 al femenino, 211 pacientes con rinitis alérgica (93 masculinos y 118 femeninos) y 171 pacientes sanos (70 masculinos y 101 femeninos).

Al analizar los datos obtenidos por grupo de edad, se encontró que en los pacientes masculinos con exacerbaciones asmáticas, el grupo de 1 – 5 años fue el que tuvo el mayor aislamiento positivo de *Mycoplasma spp* ya que fue posible aislarlo en un 30%, en cambio en los pacientes con rinitis alérgica el mayor porcentaje de aislamiento fue para el grupo de 15 años o más con un 47% y finalmente en los pacientes sanos el grupo de 15 ó más años obtuvo el mayor porcentaje de aislamiento con un 5% (Tabla 3). Estos resultados indican que en los pacientes masculinos con asma y rinitis alérgica el porcentaje de aislamiento de *Mycoplasma spp,* fue significativamente mayor con respecto a los pacientes sanos.

En el caso de los pacientes femeninos, los resultados indican que para las pacientes con crisis asmáticas, el grupo de edad con mayor aislamiento fue el 1-5 años con un 35% de aislamiento positivo, en cambio en pacientes con rinitis alérgica el grupo de 15 años o más obtuvo mayor porcentaje de aislamiento con un 43%. En pacientes sanos los resultados indican un bajo porcentaje de aislamiento para los tres grupos de edad, siendo el de 1-5

años el que obtuvo un porcentaje ligeramente mayor a los otros dos grupos con un 3.3% (Tabla 4).

Tabla 3. **Aislamiento de *Mycoplasma spp* en pacientes masculinos asmáticos, con rinitis alérgica y sanos, por grupo de edad en muestras de exudado faríngeo y orina.**

Grupo	Edad	Pacientes sexo M	Muestras de exudado faríngeo		Muestras de Orina	
			Aislamiento positivo *Mycoplasma spp* (%)	Muestras negativas (%)	Aislamiento positivo *Mycoplasma spp* (%)	Muestras negativas (%)
Pacientes asmáticos	1-5 años	20	6 (30%)	14 (70%)	1 (5%)	19 (95%)
	6-14 años	18	3 (17%)	15 (83%)	0	18 100%
	15 ó +	16	4 (25%)	12 (75%)	0	16 (100%)
Pacientes con rinitis alérgica	1-5 años	28	12 (41%)	17 (59%)	1 3%	28 (97%)
	6-14 años	24	8 (23%)	16 (77%)	0	24 (100%)
	15 ó +	30	14 (47%)	16 (53%)	1 (3%	29 (97%)
Sanos	1-5 años	25	1 (4%)	24 (96%)	0	25 (100%)
	6-14 años	26	0	26 (100%)	0	26 (100%)
	15 ó +	19	1 (5%)	18 (95%)	0	19 (100%)

Elaboración propia 2013.

Tabla 4. **Aislamiento de *Mycoplasma spp* en pacientes femeninos asmáticos, con rinitis alérgica y sanos, por grupo de edad en muestras de exudado faríngeo y orina.**

Grupo	Edad	No. de pacientes Sexo F	Muestras de exudado faríngeo		Muestras de Orina	
			Aislamiento positivo *Mycoplasma spp* (%)	Muestras negativas (%)	Aislamiento positivo *Mycoplasma spp* (%)	Muestras negativas (%)
Pacientes asmáticos	1-5 años	23	8 (35%)	15 (65%)	1 (4%)	22 (96%)
	6-14 años	31	7 (23%)	24 (77%)	1 (3%)	30 (97%)
	15 ó +	12	4 (33%)	8 (67%)	0	12 (100%)
Pacientes con rinitis alérgica	1-5 años	43	13 (30%)	30 (70%)	2 (4%)	41 (96%)
	6-14 años	31	10 (32%)	21 (68%)	1 (3%)	30 (97%)
	15 ó +	44	19 (43%)	25 (57%)	1 (2%)	43 (98%)
Sanas	1-5 años	30	1 (3.3%)	29 (96. 7%)	1 (3.3%)	29 (96.7%)
	6-14 años	33	1 (3%)	32 (97%)	1 (3%)	32 (97%)
	15 ó +	38	1 (2.6%)	37 (97.4%)	1 (2.6%)	37 (97.4%)

Elaboración propia 2013

Cabe mencionar que tanto pacientes asmáticos masculinos como femeninos pertenecientes al grupo de edad de 1-5 años mostraron una mayor prevalencia en el aislamiento de *Mycoplasma spp*, con respecto a los otros grupos de edad con un 30 y 35% respectivamente;

en cambio en pacientes con rinitis alérgica masculinos y femeninos fue más susceptible el grupo de edad de 15 años o más con un 47% y 43% respectivamente. (Tabla 3 y 4).

Al analizar específicamente los resultados de las muestras de los exudados faríngeos de los 120 pacientes asmáticos, un total de 32 (13 pacientes masculinos y 19 femeninos) obtuvieron un resultado positivo para el aislamiento de *Mycoplasmas spp.* En el caso de las muestras de orina sólo se aislaron *Mycoplasmas spp.* en 1 paciente masculino y 2 femeninos, el bajo aislamiento de *Mycoplasmas spp.* en estas muestras se debió a la poca cooperación de los pacientes para proporcionar las muestras de orina (Figura 4).

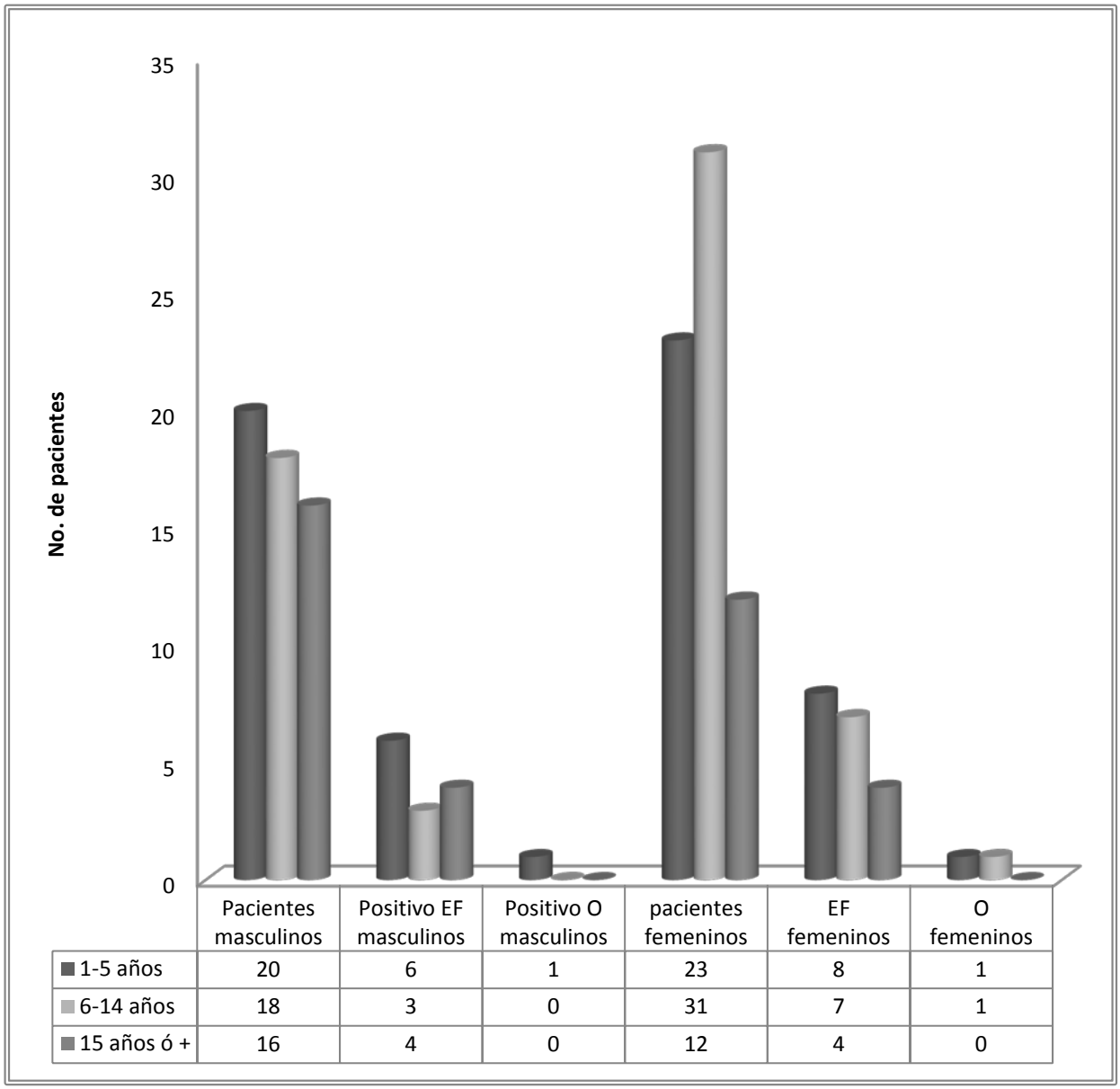
El aislamiento de *Mycoplasma spp* en pacientes asmáticos fue de un 29%, ya que de 120 pacientes asmáticos se logró aislarlo en un total de 35 muestras analizadas. (Tabla 5).

Tabla 5. **Aislamiento de *Mycoplasma spp* y su porcentaje en muestras de exudado faríngeo y orina de pacientes asmáticos, con rinitis alérgica y sanos.**

Grupo de Pacientes	Sexo	No. de pacientes	Total de pacientes por grupo	Aislamiento positivo de *Mycoplasma spp* en EF	Aislamiento positivo de *Mycoplasma spp* en O	Total de aislados (EF + O)	% de aislamiento total (EF + O)
Asmáticos	M	54	120	13	1	35	29%
	F	66		19	2		
Rinitis alérgica	M	93	211	34	2	82	38%
	F	118		42	4		
Sanos	M	70	171	2	0	7	4%
	F	101		3	2		

EF= Exudado faríngeo O= Orina

Elaboración propia 2013



EF= Exudado faríngeo O= Orina

Figura 4. **Comparación del aislamiento de *Mycoplasma spp* en muestras de exudado faríngeo y orina de pacientes asmáticos masculinos y femeninos, se muestra el número de aislamientos en los tres grupos de edades.**
Elaboración propia 2013

En el caso de las muestras analizadas de pacientes con rinitis alérgica (93 masculinos y 118 femeninos), 34 pacientes masculinos y 42 femeninos resultaron positivos al aislamiento en

exudado faríngeo para *Mycoplasma spp* (36%)*;* al realizar el análisis estadístico mediante la prueba de Kruskal Wallis test, p <0,05, se encontró que si hubo diferencia significativa en el porcentaje de aislamiento de micoplasmas entre pacientes con rinitis alérgica y el grupo control de personas sanas.

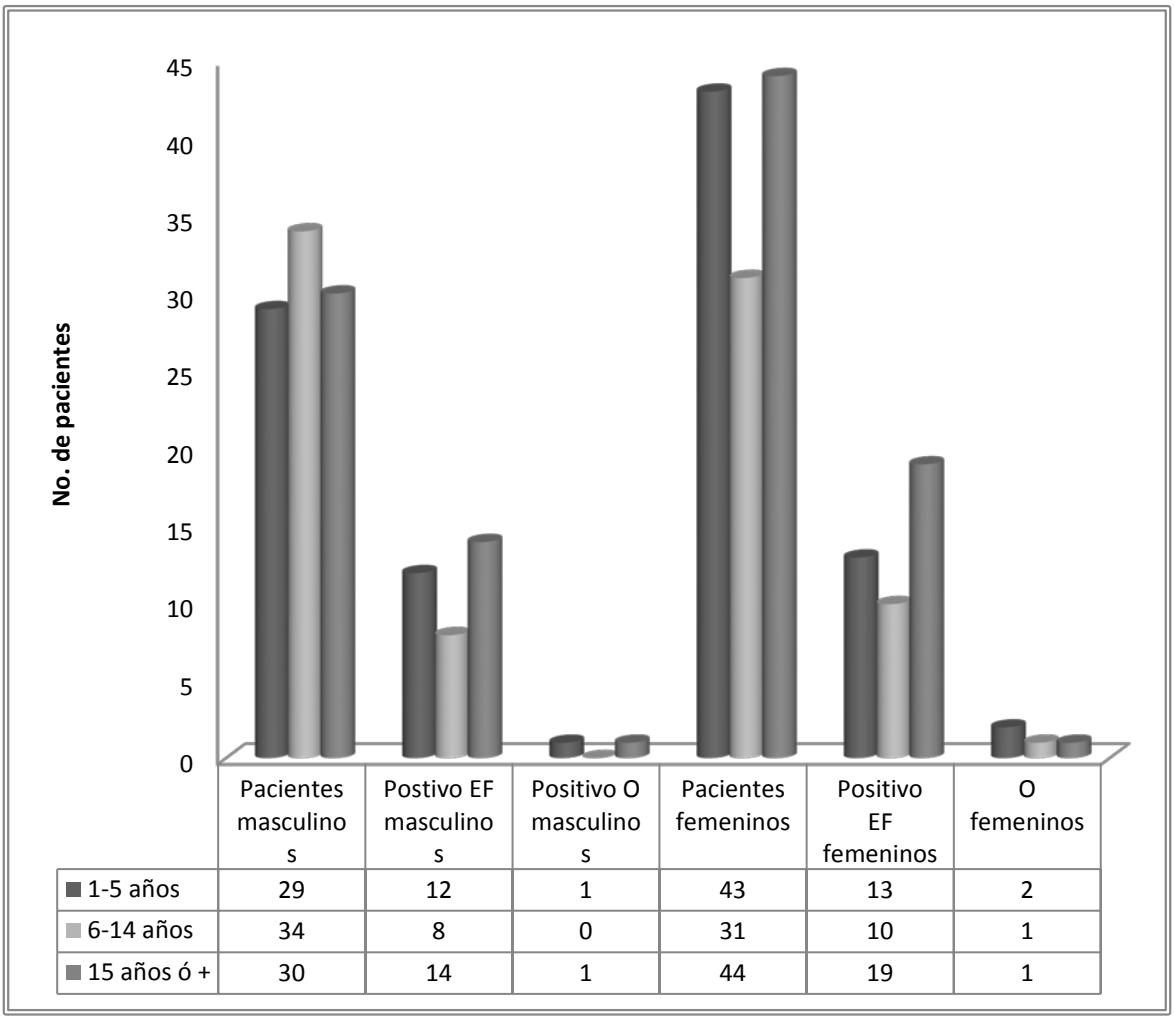
En cambio al analizar las muestras de orina de 211 pacientes con rinitis alérgica, tan sólo 2 pacientes masculinos y 4 femeninos resultaron positivos al aislamiento de *Mycoplasma spp* (Tabla 5 y Figura 5).

En relación al aislamiento de *Mycoplasma spp*, tanto en exudados faríngeos como en orina de pacientes con rinitis alérgica, los resultados indican que el 38% (82 pacientes) fueron positivos al aislamiento de *Mycoplasma spp.*

Al realizar el análisis estadístico mediante la prueba de Kruskal Wallis p> 0,05, en el porcentaje de aislamiento de *Mycoplasma spp* en pacientes con asma y rinitis alérgica, que obtuvieron un 29 y 30% respectivamente (Tabla 5), la prueba indicó que no hubo diferencia significativa en el porcentaje de aislamiento de micoplasmas entre los pacientes asmáticos y con rinitis alérgica, por lo cual el porcentaje de aislamiento en ambas enfermedades es prácticamente similar, no ocurrió lo mismo con el grupo control de personas sanas, que obtuvo un porcentaje bajo de aislamiento.

Los resultados del análisis de las muestras de pacientes sanos para el aislamiento de *Mycoplasma spp* mostraron que, en exudado faríngeo de 70 pacientes masculinos sólo dos muestras resultaron positivas, siendo negativas todas los resultados para orina. En el caso de las mujeres de 101 muestras analizadas, 3 muestras en exudado faríngeo fueron positivas y 2 en orina (Figura 6). Por lo tanto el aislamiento de *Mycoplasma spp* en pacientes sanos fue del 4% (7 muestras).

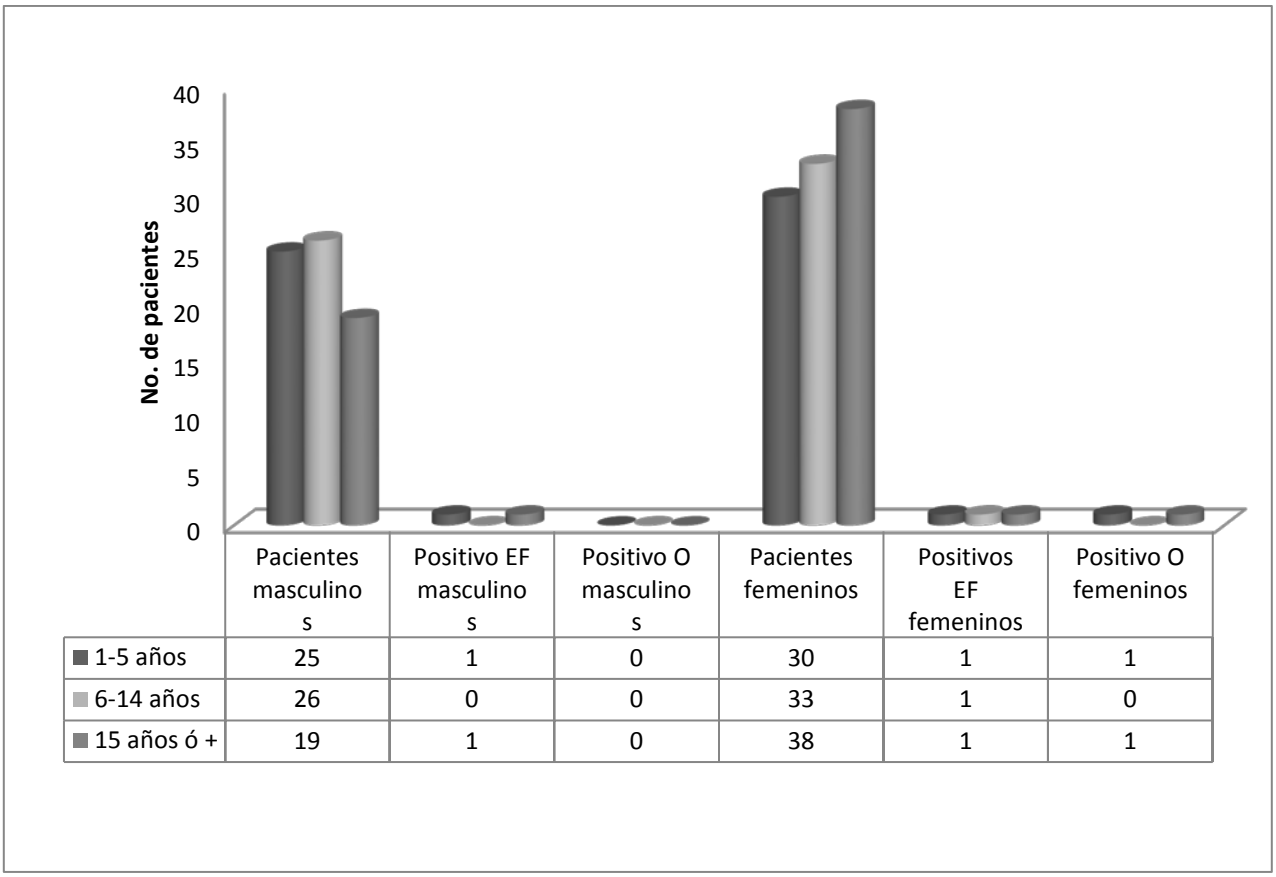
Los resultados hasta el momento indican una alta prevalencia de *Mycoplasma spp* tanto en pacientes asmáticos como en los pacientes con rinitis alérgica, y debido a que todos los pacientes enfermos estudiados presentaban una exacerbación de asma o rinitis, es posible vincular la presencia de los micoplasmas a las exacerbaciones.



	Pacientes masculinos	Postivo EF masculinos	Positivo O masculinos	Pacientes femeninos	Positivo EF femeninos	O femeninos
1-5 años	29	12	1	43	13	2
6-14 años	34	8	0	31	10	1
15 años ó +	30	14	1	44	19	1

EF= Exudado faríngeo O= Orina

Figura 5. **Comparación del aislamiento de *Mycoplasma spp* en muestras de exudado faríngeo y orina de pacientes con rinitis alérgica masculinos y femeninos, se muestra el número de aislamientos en los tres grupos de edades.**
Elaboración propia 2013.



EF= Exudado faríngeo O= Orina

Figura 6. **Comparación del aislamiento de *Mycoplasma spp* en muestras de exudado faríngeo y orina de pacientes sanos masculinos y femeninos, se muestra el número de aislamientos en los tres grupos de edades.**
Elaboración propia 2013

7.2 Detección de *Mycoplasma spp* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se realizó la detección de bacterias pertenecientes al género *Mycoplasma spp* mediante PCR en muestras de sangre de pacientes asmáticos y con rinitis alérgica, se obtuvieron los amplificados de la secuencia de 301 pb del gen ARNr 16S, la cual se ha reportado que existe en el genoma de 30 especies de micoplasmas. Los resultados indicaron

que estos oligocnucléotidos fueron específicos para la detección de *Mycoplasma spp* en las muestras empleadas (Figura 7).

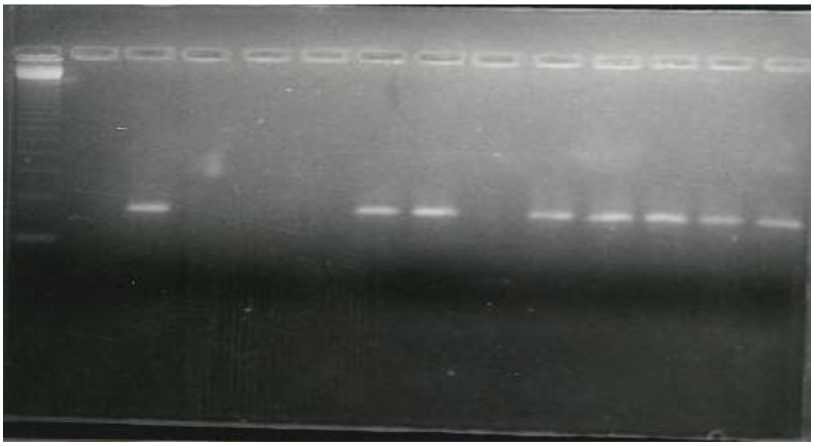


Figura 7. Gel de agarosa con el amplicon de 301 pb del gen ARNr 16S.
MP marcador de peso molecular, carril 1 control positivo, carril 2 Control Negativo, Carril 3 al 9 Muestras de aislados de *Mycoplasma spp.*
Elaboración propia 2013

7.3 Prueba de sensibilidad de Prick a extractos de alérgenos ambientales en pacientes asmáticos, con rinitis alérgica y sanos.

Los alérgenos ambientales juegan un papel importante en las exacerbaciones asmáticas y alérgicas, por lo cual en el presente trabajo fue importante la determinación de la sensibilidad de pacientes con estas enfermedades, ante diversos alérgenos ambientales mediante la prueba cutánea de Prick, cabe resaltar que dichos pacientes habían resultado positivos al aislamiento de *Mycoplasma spp*. Al realizar las pruebas cutáneas de Prick, en

los pacientes con dichas enfermedades, se probaron tres tipos de alérgenos ambientales: extractos de alérgeno intradomiciliario, forestal y maleza, ya que estos corresponden principalmente a los alérgenos ambientales que los pacientes con rinitis alérgica y asma son comúnmente más sensibles y a los cuales podrían estar expuestos de manera natural en el ambiente, además de ser los suministrados principalmente en diversos Kits de pruebas comerciales de Prick.

Un dato interesante fue que al examinar las historias clínicas de los pacientes con asma y rinitis alérgica, los pacientes referían que ellos convivían con diversos alérgenos ambientales de manera habitual, algunos mencionaron en la entrevista que contaban con perros y gatos como mascotas, otros poseían jardines y algunos más practicaban deportes al aire libre, principalmente en parques o espacios abiertos.

Los resultados de las pruebas de sensibilidad a los extractos de alérgenos de tipo intradomiciliario realizadas a los pacientes asmáticos masculinos, que fueron positivos al aislamiento de *Mycoplasma spp*, mostraron que todos los grupos fueron sensibles en un 100% al extracto de ácaro, al igual que los pacientes con rinitis alérgica, que también resultaron ser susceptibles al extracto del alérgeno ácaro (Tabla 6). Dependiendo del grupo de edad al que pertenecían los pacientes asmáticos mostraron mayor o menor susceptibilidad ante los otros extractos de tipo intradomiciliario, los niños menores a cinco años también fueron afectados por el extracto de gato en un 67%, el grupo de edad de 6 a 14 fue tan sensible al ácaro como al perro y por último los pacientes de 15 años o más también fueron susceptibles al extracto de antígeno de gato. Ambos animales gato y perro son muy frecuentes en el ambiente de la mayoría de personas.

En el caso de los pacientes sanos se encontró que los dos pacientes masculinos analizados, mostraron una susceptibilidad al extracto de ácaro del 100%, sin embargo ante los otros

extractos no mostraron sensibilidad (Tabla 6), este número de pacientes sanos a los cuales se les practicaron las pruebas cutáneas de Prick fue bajo, debido a la naturaleza de la prueba, la cual implicaba la punción de la piel del paciente, además del tiempo que los pacientes sanos tenían que invertir para que se realizara dicha prueba.

Tabla 6. **Sensibilidad a extractos de alérgenos intradomiciliarios en pacientes masculinos asmáticos, con rinitis alérgica y sanos.**

Grupo	Edad	Pacientes masculinos	Pacientes sensibles al Extracto del antígeno / % de sensibilidad			
			Ácaro	Cucaracha	Perro	Gato
Pacientes asmáticos	1-5 años	6	6 100%	1 16%	1 16%	4 67%
	6-14 años	3	3 100%	1 33%	3 100%	2 66%
	15 ó +	4	4 100%	2 50%	1 25%	3 75%
Pacientes con rinitis alérgica	1-5 años	12	12 100%	6 50%	8 66%	12 100%
	6-14 años	8	8 100%	3 38%	6 76%	7 88%
	15 ó +	14	14 100%	6 44%	10 71%	11 88%
Sanos	1-5 años	1	1 100%	0	0	0
	6-14 años	0	0	0	0	0
	15 ó +	1	1 100%	0	0	0

Elaboración propia 2013

En cuanto a las pacientes asmáticas a las cuales se les practicó la prueba de Prick, el grupo de edad de 1-5 años mostró el 100% de sensibilidad al extracto del alérgeno ácaro y los otros dos grupos de edad fueron más sensibles al extracto de cucaracha. Otros extractos de antígenos a los cuales fueron susceptibles las pacientes con asma, fueron principalmente la cucaracha y el ácaro (Tabla 7).

Las pacientes con rinitis alérgica mostraron ser susceptibles en un 100% ante el extracto de ácaro, en los grupos de niñas de 1 -5 años y de 6 a 14, y el grupo de 15 años o más obtuvo un porcentaje de sensibilidad con un 89%, estas pacientes resultaron también sensibles ante los extractos de gato y perro. Finalmente las pacientes sanas analizadas (una de cada grupo de edad), mostraron ser sensibles en un 100% al extracto de ácaro, pero insensibles ante los otros extractos probados, al igual que con los pacientes masculinos el número de muestras analizadas de personas sanas fueron pocas, debido a la poca cooperación para realizar la prueba de Prick (Tabla 7).

Tabla 7. **Sensibilidad a extractos de alérgenos intradomiciliarios en pacientes femeninos asmáticas, con rinitis alérgica y sanas.**

Grupo	Edad	Pacientes femeninos	Pacientes sensibles al Extracto del antígeno / % de sensibilidad			
			Ácaro	Cucaracha	Perro	Gato
Pacientes asmáticos	1-5 años	8	8 100%	6 75%	4 50%	5 63%
	6-14 años	7	4 57%	5 71%	2 29%	4 57%
	15 ó +	4	3 75%	3 75%	2 50%	3 75%
Pacientes con rinitis alérgica	1-5 años	13	13 100%	4 31%	10 77%	9 69%
	6-14 años	10	10 100%	5 50%	9 90%	8 80%
	15 ó +	19	17 89%	9 47%	13 68%	15 79%
Sanos	1-5 años	1	1 100%	0	0	0
	6-14 años	1	1 100%	0	0	0
	15 ó +	1	1 100%	0	0	0

Elaboración propia 2013

Al realizar las pruebas de sensibilidad en los paciente ante los extractos de los alérgenos de tipo forestal, de los 7 alérgenos probados, los pacientes masculinos asmáticos del grupo de 1-5 años mostraron una mayor sensibilidad al extracto de sauce y trueno, con un 83% en

ambos casos, seguido de un 67 % de susceptibilidad al extracto de pirúl, el grupo de niños de 6 a 14 años, fue sensible en un 100% al eucalipto, pirúl y al trueno, y el grupo de 15 años o más mostró una susceptibilidad variable ante los extractos, probablemente debido al desarrollo de su sistema inmunológico.

En el caso de los pacientes con rinitis alérgica, el grupo de 1-5 años fue sensible al extracto de trueno en un 92% y al de pirúl en un 83%, los otros grupos de edad mostraron una susceptibilidad variable. En el caso de los pacientes sanos analizados no mostraron sensibilidad a alérgenos de tipo forestal en ninguno de los grupos de edad analizados (Tabla 8).

Tabla 8. **Sensibilidad a extractos de alérgenos forestales intra y/o extradomicilarios en pacientes masculinos asmáticos, con rinitis alérgica y sanos.**

Grupo	Edad	Pacientes Masculinos	Pacientes sensibles al Extracto del antígeno / % de sensibilidad						
			Eucalipto	Pino	Encino	Pirúl	Sauce	Álamo	Trueno
Pacientes asmáticos	1-5 años	6	3 50%	3 50%	0	4 67%	5 83%	1 17%	5 83%
	6-14 años	3	3 100%	0	2 67%	3 100%	1 33%	2 66%	3 100%
	15 ó +	4	1 25%	3 75%	3 75%	2 50%	3 75%	1 25%	0
Pacientes con rinitis alérgica	1-5 años	12	7 58%	1 8.3%	3 25%	10 83%	8 66%	7 58%	11 92%
	6-14 años	8	5 63%	3 38%	2 25%	6 75%	3 38%	4 50%	5 63%
	15 ó +	14	9 64%	4 29%	8 57%	1 7%	8 57%	10 71%	12 86%
Sanos	1-5 años	1	0	0	0	0	0	0	0
	6-14 años	0	0	0	0	0	0	0	0
	15 ó +	1	0	0	0	0	0	0	0

Elaboración propia 2013

Al analizar los resultados obtenidos de las pruebas de Prick para demostrar la sensibilidad a los extractos de alérgenos de tipo forestal en pacientes asmáticas, el grupo de 1-5 años mostró ser sensible al extracto de pirúl y al de encino en un 88%, el grupo de 6-14 años, fue sensible al pirúl, álamo y trueno con un 85 % y el grupo de 15 años o más de pacientes asmáticas, resulto sensible ante el extracto de eucalipto y menos sensible ante la mayoría de extractos probados.

Las pacientes con rinitis alérgica obtuvieron porcentajes de sensibilidad variables con respecto a las asmáticas y fueron sensibles principalmente al trueno, pirul y eucalipto, en los tres grupos de edad analizados.

Cabe resaltar que el tipo de alérgenos forestales probados en la presente investigación forman parte del ambiente natural en la ciudad de Puebla, ya que es frecuente encontrar en espacios abiertos o parques, a los árboles de encino, trueno, álamo, pirul, que son representativos de la vegetación del estado de Puebla, y son también utilizados en los programas de reforestación de diversas dependencias, por lo cual es posible encontrarlos en algunos camellones o áreas verdes de fraccionamientos.

En el caso de las personas sanas estudiadas en la presente investigación, los cuales representaron al grupo control, los resultados indicaron que no mostraron sensibilidad a los extractos de alérgenos de tipo forestal probados (Tabla 9).

Tabla 9. **Sensibilidad a extractos de alérgenos forestales intra y/o extradomicilarios en pacientes femeninas con asma, rinitis alérgica y sanas.**

Grupo	Edad	Pacientes femeninos	Pacientes sensibles al Extracto del antígeno / % de sensibilidad						
			Eucalipto	Pino	Encino	Pirul	Sauce	Álamo	Trueno
Pacientes asmáticos	1-5 años	8	6 75%	4 50%	7 88%	7 88%	0	3 38%	6 75%
	6-14 años	7	3 43%	5 71%	2 29%	6 86%	4 57%	6 86%	6 86%
	15 ó +	4	3 75%	0	0	1 25%	1 25%	1 25%	3 75%
Pacientes con rinitis alérgica	1-5 años	13	10 77%	3 23%	2 15%	5 38%	8 61%	1 7.6%	9 69%
	6-14 años	10	5 50%	3 30%	7 70%	9 90%	1 10%	0	7 70%
	15 ó +	19	14 74%	8 42%	5 26%	8 42%	4 21%	3 16%	10 53%
Sanos	1-5 años	1	0	0	0	0	0	0	0
	6-14 años	1	0	0	0	0	0	0	0
	15 ó +	1	0	0	0	0	0	0	0

Elaboración propia 2013

Por último con respecto a las pruebas de Prick en pacientes asmáticos probados contra los extractos de alérgenos de tipo maleza, los pacientes asmáticos fueron susceptibles principalmente al pasto en los tres grupos de edad, esto no es de sorprender, ya que es el principal alérgeno de tipo maleza reportado, el grupo de edad de 1-5 años fue sensible también al extracto de girasol con un 66% los otros grupos de edad mostraron ser susceptibles también ante el extracto de epazote. Los pacientes con rinitis alérgica en los tres grupos de edad analizados fueron susceptibles al pasto y cardo principalmente. En cambio las personas sanas no fueron susceptibles a los extractos de estos alérgenos (Tabla 10).

Tabla 10. **Sensibilidad a extractos de alérgenos de tipo maleza en pacientes masculinos asmáticos, con rinitis alérgica y sanos.**

Grupo	Edad	Pacientes masculinos	Pacientes sensibles al Extracto del antígeno / % de sensibilidad				
			Girasol	Lengua	Pasto	Cardo	Epazote
Pacientes asmáticos	1-5 años	6	4 67%	3 50%	5 83%	3 50%	0
	6-14 años	3	1 33%	2 67%	3 100%	1 33%	2 67%
	15 ó +	4	2 50%	1 25%	3 75%	1 25%	3 75%
Pacientes con rinitis alérgica	1-5 años	12	7 58%	4 30%	10 83%	9 75%	1 8.3%
	6-14 años	8	3 38%	2 25%	8 100%	5 63%	4 50%
	15 ó +	14	6 43%	7 50%	12 86%	8 57%	9 64%
Sanos	1-5 años	1	0	0	0	0	0
	6-14 años	0	0	0	0	0	0
	15 ó +	1	0	0	0	0	0

Elaboración propia 2013

Con respecto a los extractos de alérgenos de tipo maleza, probados en las pacientes asmáticas, los resultados son muy similares a los obtenidos por pacientes masculinos, ya que en los tres grupos de edad, las pacientes resultaron ser más sensibles al extracto de pasto y cardo, seguido del extracto de lengua de vaca. En el caso de las pacientes con rinitis alérgica en el grupo de 1-5 años, fueron las más susceptibles en un 92% al extracto de pasto, con respecto a los otros dos grupos analizados, la susceptibilidad ante los otros extractos probados fue variable. Las personas sanas analizadas no mostraron susceptibilidad ante los extractos probados. (Tabla 11).

Tabla 11. **Sensibilidad a extractos de alérgenos de tipo maleza en paciente asmáticas, con rinitis alérgica y sanas.**

Grupo	Edad	Pacientes femeninos	Pacientes sensibles al Extracto del antígeno / % de sensibilidad				
			Girasol	Lengua	Pasto	Cardo	Epazote
Pacientes asmáticas	1-5 años	8	3 38%	5 63%	7 88%	6 75%	0
	6-14 años	7	2 29%	6 86%	6 86%	5 71%	2 29%
	15 ó +	4	1 25%	1 25%	4 100%	3 75%	2 50%
Pacientes con rinitis alérgica	1-5 años	13	4 31%	6 46%	12 92%	7 54%	1 7.7%
	6-14 años	10	5 50%	7 70%	9 90%	2 20%	1 10%
	15 ó +	19	9 47%	3 16%	16 84%	4 21%	7 37%
Sanas	1-5 años	1	0	0	0	0	0
	6-14 años	1	0	0	0	0	0
	15 ó +	1	0	0	0	0	0

Elaboración propia 2013

Los resultados de la sensibilidad ante los extractos de alérgenos de tipo intradomiciliario, forestal y maleza en pacientes asmáticos y pacientes con rinitis alérgica, se resumen en las figuras 8 y 9.

Los pacientes asmáticos a los cuales se les aisló *Mycoplasma spp,* fueron más sensibles al extracto de ácaro y cucaracha, seguido del extracto de gato y perro, en cambio los pacientes con rinitis alérgica fueron más sensibles al extracto de ácaro, gato y perro; y menos sensibles al extracto de cucaracha (Figuras 8 y 9), , algunos pacientes referían en la entrevista que a pesar de saber que eran alérgicos a animales como son el gato y perro, no

estaban dispuestos a dejar de convivir con ellos, lo cual explicaría el alto índice de sensibilidad ante este factor ambiental, con respecto al ácaro es el principal alérgeno que encontramos en el polvo presente el interior de las casas, pelo de animales e incluso en objetos.

En cuanto a los alérgenos de tipo forestal, tanto los pacientes asmáticos y con rinitis alérgica resultaron ser más sensibles al extracto de pirul, trueno; álamo y eucalipto, que como se había comentado son árboles que se encuentran de manera frecuente en el ambiente, y que de acuerdo a las prácticas al aire libre de cada paciente, la exposición puede ser mayor o menor. Con respecto a los alérgenos tipo maleza el extracto de pasto, la lengua de vaca y el cardo fueron los alérgenos a los que los pacientes asmáticos y con rinitis alérgica tuvieron mayor sensibilidad (Figuras 8 y 9), la frecuencia de exposición puede ser variante, ya que depende del estilo de vida de cada paciente.

El grupo control no mostró sensibilidad ante alérgenos forestales y malezas, sin embargo fueron sensibles sólo al extracto de ácaro, lo cual representa un aspecto interesante a estudiar en un futuro.

Es relevante notar el comportamiento similar de susceptibilidad ante los alérgenos ambientales, entre los pacientes asmáticos y con rinitis alérgica, además ambos grupos obtuvieron porcentajes similares de aislamiento de *Mycoplasma spp,* lo cual puede ser un indicador de que los pacientes que están infectados con el microorganismo, pueden desencadenar reacciones de alergia ante factores ambientales como es observado en nuestros resultados y conducirlos en algunos casos a respuestas inmunológicas exacerbadas, algunos autores mencionan incluso que la rinitis alérgica puede ser desencadenante del asma, aunque esto es un aspecto muy controversial.

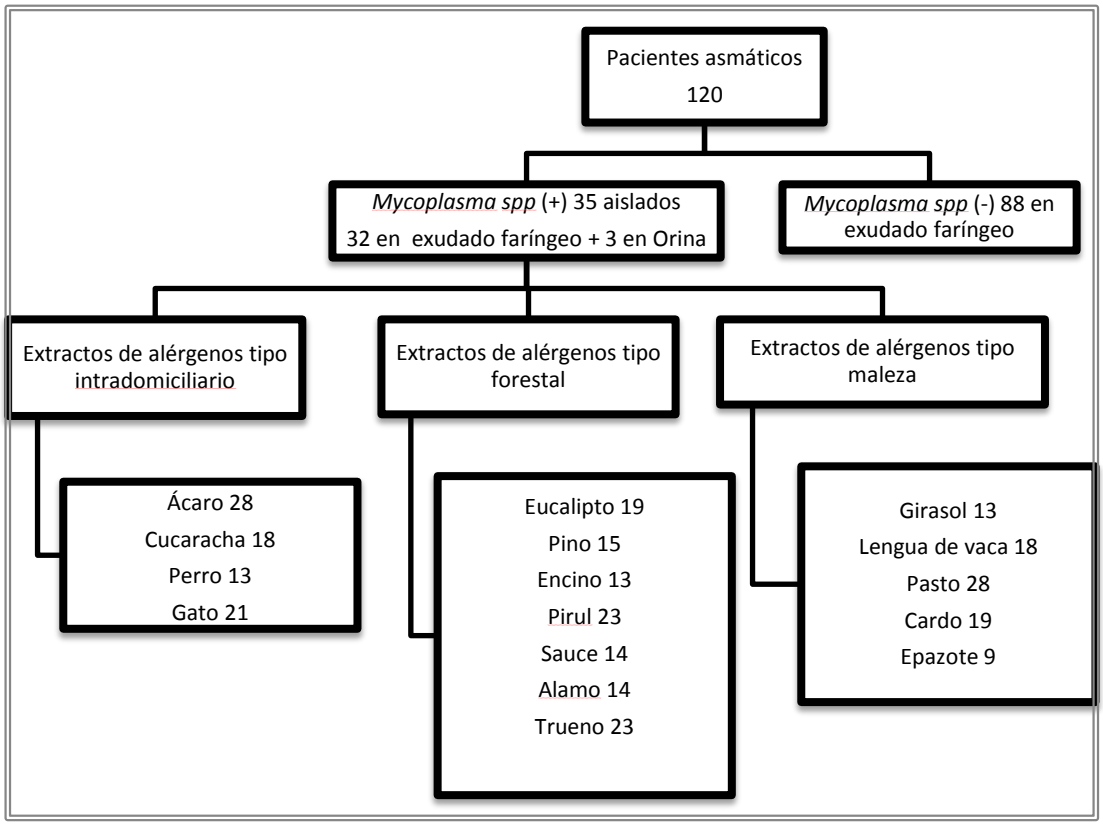


Figura 8. **Esquema de comparación en número de pacientes asmáticos positivos al aislamiento de *Mycoplasma spp* y su susceptibilidad ante extractos de alérgenos ambientales. Se presentan la cantidad de pacientes asmáticos que resultaron susceptibles a cada uno de los tres tipos de extractos de alérgenos ambientales utilizados en la Prueba de Prick.**
Elaboración propia 2013

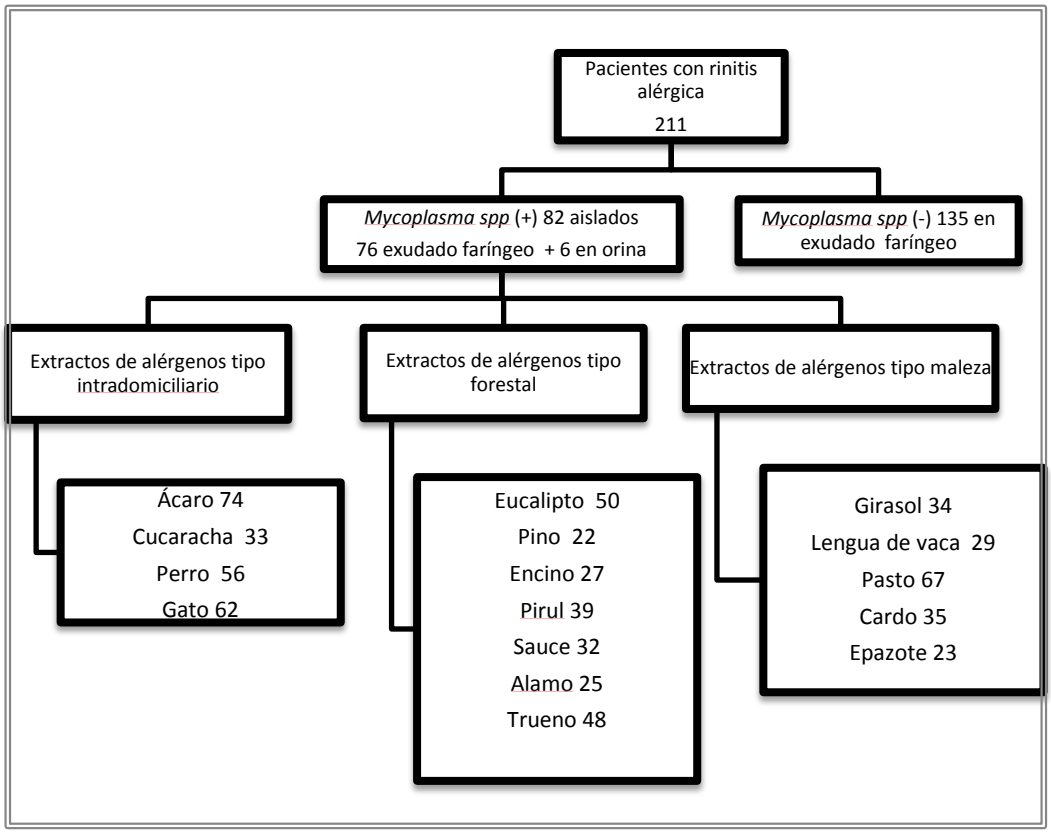


Figura 9. **Esquema de comparación en número de pacientes con rinitis alérgica positivos al aislamiento de *Mycoplasma spp* y su susceptibilidad ante extractos de alérgenos ambientales. Se presentan la cantidad de pacientes con rinitis alérgica que resultaron susceptibles a cada uno de los tres tipos de extractos de alérgenos ambientales utilizados en la Prueba de Prick.**
Elaboración propia 2013.

8. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio apoyan lo reportado en la literatura, donde se vincula la presencia de diversos géneros de micoplasmas, con enfermedades infecciosas crónicas en varias especies animales, incluyendo el hombre y recientemente se le ha vinculado con enfermedades del tracto respiratorio. [39, 43, 46, 56, 57] En esta investigación se determinó la presencia del microorganismo *Mycoplasma spp* en un 29% de las muestras de pacientes asmáticos y en un 38% en pacientes con rinitis alérgica, resaltando de manera evidente la prevalencia de este agente microbiológico, con alteraciones del sistema respiratorio como son el asma y la rinitis alérgica, al momento de una exacerbación, ya que las muestras fueron tomadas debido a que los pacientes recurrieron al servicio de alergología de HU en un estado de crisis. El porcentaje de aislamiento de micoplasmas en el grupo control fue de un 4%, lo cual podría explicarse, de acuerdo a lo expuesto por Dávila en 2010, que hace hincapié en que el contacto entre los pacientes enfermos y sus familiares, conduce a que 25% a 71% de los familiares se infectan con micoplasmas, incluso permaneciendo sin síntomas. [61] En esta investigación el grupo control estaba constituido por familiares de pacientes asmáticos o con rinitis alérgica, concordando con esta evidencia.

Los Microorganismos y alérgenos juegan un papel importante en las crisis del asma debido a que inducen una respuesta inflamatoria, los estudios indican que las exacerbaciones de asma son causadas principalmente por infecciones atípicas bacterianas y virales; siendo los rinovirus los más comunes detectados después de una exacerbación del asma, sin embargo existe evidencia reciente, de que las infecciones bacterianas causadas por *Mycoplasma spp* y *Chlamydia* spp, también pueden relacionarse con el asma crónica y potenciar las exacerbaciones del asma, la evidencia de estos estudios en humanos vincula tanto

Mycoplasma pneumoniae y *Chlamydophila pneumoniae* con las sibilancias, exacerbaciones asmáticas frecuentes y disminución a largo plazo de la función pulmonar, lo que sugiere que los microorganismos pueden desempeñar un papel importante en la historia natural del asma y lo acreditan como un factor de su patogénesis. [62-67] Al respecto un estudio realizado en el año 2000 por S. Esposito *et al* mostró una relación significativa entre la infección por gérmenes atípicos (*M. pneumoniae* y *Chlamidia pneumoniae*) en niños con sibilancias, especialmente con sibilancias recurrentes, que son síntomas del asma y otras enfermedades respiratorias. [62]

El papel de los micoplasmas en las exacerbaciones del asma y otras enfermedades respiratorias puede ser debido a que estos microorganismos, son capaces de estimular, así como suprimir los linfocitos en manera no específica policlonal, estas habilidades mostradas por los micoplasmas, y la evidencia de estudios realizados en modelos animales con infecciones agudas y crónicas inducidas por estas bacterias; indican que tienen la capacidad de modular la sensibilización alérgica, la fisiología pulmonar, y la respuesta inmune a desafíos ante alérgenos. [69]

Los estudios serológicos realizados en diferentes países han mostrado que *M. pneumoniae* presenta un patrón de infecciones cíclicas con enfermedades endémicas puntuadas por epidemias, que se presentan cada 3 a 5 años, en personas mayores, así como en niños menores de 5 años, [48] este dato concuerda con el hallado en la presente investigación, ya que el aislamiento de *Mycoplasma spp* en el caso de los pacientes asmáticos, fue mayor en el grupo de edad de niños de 1 a 5 años, que pueden ser más sensibles a la invasión microbiana, debido a la inmadurez de su sistema inmunológico.

En el caso de la rinitis alérgica es un trastorno común que afecta hasta un 40% de la población, siendo la más común la rinitis crónica, que afecta a 10 a 20% de la población, y

la evidencia sugiere que la prevalencia de la enfermedad está incrementando. La rinitis alérgica grave se ha asociado con alteraciones significativas en la calidad de vida, tales como el sueño y su entorno ambiental en el lugar de trabajo. [70] En este estudio se encontró que el 36% de los pacientes con rinitis alérgica fueron positivos para *Mycoplasma spp*, por lo cual los resultados podrían sugerir que la colonización por el agente infeccioso micoplasma puede verse favorecida en pacientes que padecen rinitis alérgica, además de acuerdo a lo indicado en las historias clínicas, el estilo de vida desempeña un papel fundamental en la sensibilidad ante diversos alérgenos probados en esta investigación, donde las exacerbaciones tanto de la rinitis alérgica como el asma pueden vincularse a la exposición de factores ambientales que la desencadenen. Algunos estudios han demostrado que la mayoría de los pacientes positivos a la prueba de punción cutánea de Prick, la cual es utilizada para determinar su sensibilidad a diversos alérgenos ambientales, son niños menores de 10 años, [70] concordando con los grupos más sensibles de esta investigación.

La rinitis es el síntoma más común en las personas positivas a la prueba de Prick y puede estar asociada o no con el asma o la conjuntivitis, incluso se ha asociado a la rinitis como agente favorecedor de padecer asma [71], los resultados de esta investigación demuestran que la sensibilidad a alérgenos ambientales tanto en pacientes con asma o rinitis alérgica es similar, además no existió diferencia significativa entre el aislamiento de micoplasma en ambas enfermedades, por lo cual podrían estar sumamente relacionadas, sustentando la evidencia de que una puede favorecer a la otra.

Una de las contribuciones del presente estudio, fue realizar el aislamiento de *Mycoplasma spp* en pacientes con sintomatología de rinitis alérgica, pero sin presentar asma, ya que en la actualidad no se cuenta con estudios como el presente en la literatura reportada, la cual se ha enfocado más hacia el estudio de los pacientes asmáticos y su etiología con respecto a

agentes microbiológicos, por lo cual se vislumbra un campo de investigación en otras enfermedades respiratorias crónicas como la rinitis alérgica y su relación con los micoplasmas. .

Un aspecto relevante es que a pesar de la información que existe en la actualidad con respecto a las infecciones causadas por diversas especies de micoplasmas en el humano, aún falta mucho por conocer acerca de su patogénesis y factores de virulencia, en otras etiologías como el asma y la rinitis alérgica, así como la importancia médica que se les debe de dar, ya que la mayoría de las veces no se tiene el conocimiento sobre estos microorganismos y las características de las infecciones que causan, por lo que su diagnóstico es erróneo y como consecuencia se proporciona un tratamiento inadecuado. [40, 61, 62] Incluso muchos de los pacientes que podrían estar infectados con *Mycoplasma spp* son diagnosticados con otras enfermedades, debido al desconocimiento o a la falta de exámenes microbiológicos o de confirmación como el PCR, que confirmen la presencia de estos microrganismos en los pacientes, esta técnica en diversos estudios ha mostrado ser efectiva para la detección de *Mycoplasma spp*. [72, 73]

Cabe resaltar que en esta investigación, el número total de muestras recolectadas (502), para el cultivo y aislamiento de *Mycoplasma spp,* fue significativo, cada una de estas muestras fue procesada por métodos microbiológicos y se obtuvieron un total de 124 aislados positivos por cultivo microbiológico, los cuales fueron caracterizados por microscopía, como pertenecientes al género *Mycoplasma*, y algunos de los aislados fueron corroboradas como pertenecientes al género *Mycoplasma* por técnicas de biología molecular como la detección por PCR, la cual resultó ser efectiva, en las muestras empleadas, pero debido al alto costo de la técnica para el análisis de las muestras, así como a la falta de oligonucleótidos específicos para la amplificación de cada una de las especies

pertenecientes al género, este estudio se limitó sólo a la determinación del género *Mycoplasma.*

En la actualidad la detección por PCR de este microrganismo en muchos de los hospitales aún no es posible, debido principalmente al costo del equipo, material y personal con capacitación para realizar esta técnica.

El tener un diagnóstico oportuno de la infección con *Mycoplasma spp* permitirá al médico indicar el tratamiento adecuado con antibióticos, ya que se ha demostrado que los macrólidos producen mejoría clínica, radiológica y erradicación microbiológica en el caso de *M .pneumoniae,* [74-76] sin embargo se prefiere el uso de macrólidos nuevos, como claritromicina y azitromicina, por sobre la eritromicina, debido a que son más fáciles de administrar al paciente, además de ser más tolerable su aplicación. [75-77]

La sensibilización alérgica y síntomas respiratorios de la exposición a alérgenos forman parte del espectro clínico del asma y la rinitis alérgica en muchos niños y adultos. Esta es una de las razones por la cual se determinó la sensibilidad a los extractos de diversos alérgenos ambientales en este estudio. Con respecto a los resultados obtenidos al realizar las pruebas de sensibilidad contra extractos de alérgenos de tipo intradomiciliario, los resultados indicaron; que tanto los pacientes asmáticos como los de rinitis alérgica fueron sensibles al extracto de ácaro, la evidencia en la literatura muestra que los ácaros se encuentran de forma natural en el polvo casero, por lo tanto son prevalentes en los hogares de pacientes con asma en áreas geográficas húmedas [77-82], por lo que la exposición a estos antígenos puede desencadenar reacciones de hipersensibilidad. Los pacientes asmáticos mostraron también sensibilidad al extracto del antígeno de gato y cucaracha, con respecto a esta respuesta de sensibilidad, los estudios demuestran que la cucaracha, es uno de los principales alérgenos que sensibilizan a los pacientes en las ciudades y es una de las causas

del asma en pacientes asmáticos que viven en el medio urbano, [80] además por la naturaleza cosmopolita de este insecto es posible encontrarlo en una gran diversidad de ambientes.

En el caso de los pacientes con rinitis alérgica, estos fueron susceptibles al extracto de ácaro, gato y perro, los cuales son alérgenos que se encuentran frecuentemente en los hogares de estos pacientes, lo cual fue corroborado por las entrevistas de los mismos pacientes al momento de realizar su historia clínica, los estudios también demuestran que el dermatofagoide (ácaro), es uno de los alérgenos que más frecuentemente causa enfermedades alérgicas, predominando el *D. pteronyssinus* seguido por el *D. farinae* del 75 a 90% de los niños con síntomas perennes de asma o rinitis que tienen pruebas cutáneas positivas a estos ácaros. [78, 79]

Los pacientes que padecen asma o rinitis alérgica no sólo están expuestos a antígenos de tipo intradomiciliario, si no que además estan expuestos a diversos factores ambientales, que podrían desencadenar reacciones alérgicas e incluso exacerbaciones de su enfermedad, esta investigación indicó, que los pacientes asmáticos y con rinitis alérgica mostraron una susceptibilidad similar a los alérgenos de tipo forestal y maleza, ya que ambos grupos de pacientes mostraron mayor susceptibilidad al trueno y pirul principalmente, estos árboles forman parte de la vegetación natural del estado de Puebla, incluso podemos encontrar este tipo de vegetación en espacios como áreas verdes y camellones, con respecto a la sensibilidad de los dos tipos de pacientes ante los extractos de alérgenos de tipo maleza, la respuesta de mayor sensibilidad en ambos casos fue hacía el extracto del antígeno de pasto, el cual es uno de los principales factores ambientales a los que en la actualidad se desarrolla reacciones alérgicas, un estudio muy interesante muestra que los niños que crecieron en ambientes rurales acostumbrados al contacto con el pasto y otras plantas, tienen una menor probabilidad de expresar síntomas alérgicos. [14]

Lo expuesto en esta investigación indicó que existe una posible relación entre el aislamiento de *Mycoplasma spp* en pacientes con asma y rinitis alérgica y la expresión de sensibilización alérgica y síntomas respiratorios. Ya que los pacientes analizados padecían exacerbaciones de sus enfermedades, los cuales son resultado de diversos factores como son la exposición a alérgenos ambientales, además de un sistema inmunológico que enfrenta la infección crónica por micoplasmas, esto conduce a replantear la influencia tanto de la infección microbiana por *Mycoplasma spp* y el papel de los factores ambientales en las exacerbaciones del asma y la rinitis alérgica, abriendo un campo de investigación en la relación medio ambiente y salud.

9. CONCLUSIONES

- En el presente estudio fue posible el aislamiento e identificación de *Mycoplasma spp* en muestras proveniente de pacientes con asma y rinitis alérgica con un 29% y 38 % respectivamente. En cambio en el grupo control se obtuvo un porcentaje de aislamiento de 4%. Lo cual hace evidente la posible relación entre la presencia del microorganismo y el curso de la enfermedad, ya que los pacientes acudían al servicio de alergología bajo una crisis (exacerbación).
- En pacientes asmáticos tanto pacientes masculinos como femeninos pertenecientes al grupo de edad de 1-5 años, con respecto a los de otras edades, mostraron una mayor prevalencia en el aislamiento de *Mycoplasma spp*.
- El grupo control constituido por los pacientes sanos tanto masculinos como femeninos, mostró que sólo el 4% de las muestras resultaron positivas al aislamiento de *Mycoplasma spp,* lo cual representa un porcentaje bajo con respecto al obtenido por los pacientes asmáticos y con rinitis alérgica.
- Al realizar las pruebas de Prick en pacientes que resultaron positivos al aislamiento de *Mycoplasma spp,* los resultados indicaron que tanto pacientes masculinos como femeninos fueron más susceptibles al extracto del alérgeno ácaro.
- Los pacientes con rinitis alérgica masculinos y femeninos fueron sensibles principalmente al extracto del alérgeno de tipo intradomiciliario ácaro.
- Al realizar las pruebas con extractos de alérgenos de tipo forestal, los pacientes asmáticos tanto masculinos como femeninos, resultaron ser susceptibles principalmente a los extractos de pirul, trueno y eucalipto.

- Los resultados de las pruebas de Prick de pacientes con rinitis alérgica ante alérgenos ambientales de tipo forestal, evidenciaron que ellos fueron más susceptibles a los extractos de eucalipto, trueno y el pirul.
- En las pruebas de susceptibilidad a extractos de alérgeno de tipo maleza, los pacientes asmáticos masculinos y femeninos, que resultaron positivos al aislamiento de *Mycoplasma spp* fueron más susceptibles a los extractos de pasto, cardo y lengua de vaca.
- En cuanto a los pacientes con rinitis alérgica analizados ante los extractos de alérgenos de tipo maleza, resultaron con mayor susceptibilidad al pasto, cardo y girasol.
- Los pacientes sanos (masculinos y femeninos), no mostraron susceptibilidad a los alérgenos de tipo forestal y maleza.
- Debido al considerable porcentaje del aislamiento de *Mycoplasma spp* en muestras de pacientes asmáticos y con rinitis alérgica, con respecto al encontrado en pacientes sanos, y la sensibilidad de dichos pacientes ante alérgenos ambientales, es posible suponer que existe una relación entre el aislamiento de *Mycoplasma spp,* su susceptibilidad a diversos alérgenos ambientales (tales como extractos de alérgenos intradomiciliarios, forestales y malezas). y las exacerbaciones del asma y la rinitis alérgica, que los hicieron acudir al servicio de alergología del HUP.

10. PERSPECTIVA

Hace falta realizar mayor investigación con respecto a los casos de pacientes asmáticos y con rinitis alérgica, que resultaron positivos al aislamiento de *Mycoplasma spp* con la finalidad de esclarecer el papel que desempeñan estos microrganismos en la etiología de estas enfermedades.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guía de Práctica Clínica. Diagnóstico y tratamiento del asma en menores de 18 años de edad en el primero y segundo nivel de atención. Actualización 2013. Guía de Referencia Rápida. Catálogo Maestro de GPC SOOO9-08. CENETEC. Disponible en: http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/009_GPC_Asmamenor18a/SS_009_08_EyR.pdf
2. Flores JE, Yáñez SJA, Cedillo RML, Morán PJL. Some Environmental and Socio-Economic Factors Associated to Asthma Establishment in Populations with Different Sanitary Conditions. International Journal of Applied Science and Technology. 2013; 3(8): 4-14.
3. Ege MJ, et al. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. N Engl J Med. 2011; 364: 701-709
4. Stensballe LG, Simonsen J, Jensen SM, Bonnelykke K, Bisgaard H. Use of antibiotics during pregnancy increases the risk of asthma in early childhood. J Pediatr. 2013; 162: 832-838.
5. Guía de Práctica Clínica. Diagnóstico y tratamiento de la rinitis alérgica. Evidencias y recomendaciones. Actualización 2009. Catálogo Maestro de GPC IMSS 041-08. CENETEC. Disponible en: http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/041_GPC_RinitisAlergica/IMSS_041_08_EyR.pdf
6. Frederick JM, Warner JO, Jessop WJ, Enander I, Warner JA. Effect of a bed covering system in children with asthma and house dust mite hypersensivity. Eur Respir J. 1997; 10: 3611-3616.

7. Ng ML, Warlow RS, Chrishanthan N, Ellis C, Walls R. Preliminary criteria for definition of allergic rhinitis: a systematic evaluation of clinical parameters in a disease cohort (I). Clin Exp Allergy. 2000; 30:1314-1331.
8. Skoner DP. Allergic rhinitis: definition, epidemiology, pathophysiology, detection and diagnosis. J Allergy Clin Immunol. 2001; 108:2-8.
9. Terreehorst I, Hak E, Oostng AS. Evaluation of impermeable covers for bedding in patiens with allergic rhinitis. N Engl J Med. 2003; 349: 237-246.
10. Burke W, Fesinmeyer M, Reed K, Hampson L, Carlsten C. Family history as a predictor of asthma risk. Am J Prev Med. 2003; 24(2): 160–169.
11. Reed SC. Asthma in the United States: burden and current theories. Environ Health Perspect. 2002; 110(S4): 557–560.
12. Illi S, Von Mutius E, Lau S, Bergmann R, Niggemann B, Sommerfeld C, et al. Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth cohort study. Br Med J. 2001; 322(7283): 390–395.
13. Bresciani M, Parisi C, Manghi G, Bonini S. The hygiene hypothesis: does it function worldwide? Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2005; 5: 147–151.
14. Bäcker C, Barraza VA, Moreno MH, Escamilla NC, Romieu I. Efecto del ambiente rural sobre la prevalencia de rinitis alérgica en escolares de Mexicali, Baja California, México. Rev Panam Salud Pública. 2009; 25(5): 431-437.
15. Brozek JL, Baena CEC, Bonini S, Canonica GW, Rasi G, Van WRG, Zuberbier T, Guyatt G, Bousquet J, Schünemann HJ. Methodology for development of the Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma Guideline. 2008; 63: 38-46.
16. Bousquet J. Allergic rhinitis and its impact. J Allergy Clin Immunol. 2001; 108:S147-336

17. Gaga M, Lambrou P, Papageorgiou N, Koulouris N, Kosmas E, Fragakis S. Eosinophils are a feature of upper and lower airway pathology in non-atopic asthma, irrespective of the presence of rhinitis. Clin Exp Allergy. 2000; 30: 663-669.
18. Bachert C, Vignola A, Gevaert P, Leynaert B, Van Cawenberge P, Bousquet J. Allergic rhinitis, rhinosinusitis and asthma: one airway disease. Immunol Allergy Clin N Am. 2004; 24: 19-43.
19. Global Initiative for asthma (GINA) Global Strategy for asthma management and prevention, 2006. Disponible en: http://www.ginasthma.org/
20. Green RH, Bringhtling CE, Mckenna S, Hargadon B, Parker D, Bradding P. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts and radomised controlled trial. Lancet. 2002; 306 (9347): 1715-1721.
21. Guevara JP, Wolf FM, Grum CM, Clark NM. Effects of interventions of self management of asthma in children and adolescents: systematic review and metaanalysis. BMJ. 2003; 326 (7402): 1308-1309.
22. Waltraud E, Markus JE, Mutius VE. The asthma epidemic. New Engl J Med. 2006; 3 (55): 2226-2235
23. Baeza BM, Romero TS, Graham ZL, Albertos AN. Incremento de la frecuencia de asma en niños escolares de Villahermosa, Tabasco, México. Rev Alerg Mex. 2003; 50: 208-213.
24. Vargas MH, Díaz MGS, Furuya ME, Salas J. Trends of asthma in México: an 11 years analysis in a nationwide institution. Chest. 2004; 125: 1993-1997.
25. Peters GM. The alveolar macrophage: the forgotten cell in asthma. Am J Respir Cell Mol Biol. 2004; 31(1): 3-7.

26. Menard G, Bissonnette EY. Priming of alveolar macrophages by leukotriene D (4): potentiation of inflammation. Am J Respir Cell Mol Biol. 2000; 23(4): 572-577.

27. Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Neutrophilic Inflammation in Severe Persistent Asthma. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1999; 160(5): 1532-1539.

28. Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. Annu Rev Immunol. 2006; 24: 147-74.

29. Sur S. Sudden-onset fatal asthma. A distinct entity with few eosinophils and relatively more neutrophils in the airway submucosa? Am Rev Respir Dis. 1993; 148(3): 713-719.

30. Kay AB. The role of T lymphocytes in asthma. Chem Immunol Allergy. 2006; 91:59-75.

31. Macaubas C. Association between antenatal cytokine production and the development of atopy and asthma at age 6 years. The Lancet. 2003; 362(9391): 1192-1197.

32. Allison LM, Nicholas WL. Chemokine receptors: understanding their role in asthmatic disease. Immunology and allergy clinics of North America. 2004; 24(4): 667-683.

33. Basehore, M.J. A comprehensive evaluation of IL4 variants in ethnically diverse populations: association of total serum IgE levels and asthma in white subjects. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2004; 114(1): 80-87.

34. Loza MJ, Chang BL. Association between Q551R IL4R genetic variants and atopic asthma risk demonstrated by meta-analysis. J Allergy Clin Immunol. 2007; 120(3): 578-585.

35. Kraft M. Cassell GH, Henson JE. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in the Airways of Adults with Chronic Asthma. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1998; 158(3): 998-1001.

36. Gil C, Cedillo RML, Mayagoitia BG, Paz MD. Isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from asthmatic patients. Annals of Allergy. 1993; 70(1): 23-25.

37. Cook, PJ. *Chlamydia pneumoniae* and asthma. Thorax. 1998, 53(4): 254-259.

38. Tully JG. Current status of the mollicutes flora of human. Clin Infect Dis. 1993; 17: 2-9.

39. Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Micobiol Mol Biol Rev. 1998; 62: 1094-1156.

40. Cervantes GE. Micoplasmas patógenos para el humano. Rev. Fac. Med UNAM. 2009; 52: 253-259.

41. Carreazo- Pariasca J. Fisiopatología de las infecciones por *Mycoplasma pneumoniae.* Pathophysiology of *Mycoplasma pneumoniae* infections. Paediatrica. 2003; 5(2).

42. Waites K, Talkington D. New developments in human diseases due to mycoplasmas. In: Blanchard A, Browning G, editors. Mycoplasmas molecular biology pathogenicity and strategies for control. Oxford: Horizon Bioscience. 2005. pp 319–323.

43. Cassell GH, Waites KB, Crouse DT. Mycoplasmal infections. In Infectious diseases of the fetus and newborn infant. Remington JS, Klein KO eds. W. B. Saunders Co, Inc Philadelphia, 2001. pp 733-767.

44. Taylor-Robinson D. Infections due to species of mycoplasmas and ureaplasmas: an update. Clin Infect Dis. 1996; 23: 671- 684.

45. Tully JG. Mollicute-host interrelationship: current concepts and diagnostic implications. En Tully JG, Razin S. Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmatology. San Diego: Academic Press, 1996. p 1-21.

46. Rivera-Tapia JA, Cedillo-Ramírez ML, Vega-Benítez M. Micoplasmas y su importancia médica. Rev Biomed. 2001; 12: 262-267.

47. Esposito S, Cavagna R, Bosis S, Droghetti R. Emerging role of *Mycoplasma pneumoniae* in children with acute pharingitis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2002; 21: 607-610.

48. Dorigo-Zetsma JW, Wilbrink B, van der Nat H, Bartelds AI, Heijnen ML. Results of molecular detection of *Mycoplasma pneumoniae* among patients with acute respiratory infection and in their household contacts reveals children as human reservoirs. J Infect Dis. 2001; 183: 675-678.

49. Talkington DF, Waites KB, Schwartz SB, Besser RE. Emerging from obscurity, understanding pulmonary and extrapulmonary syndromes, pathogenesis and epidemiology of human *Mycoplasma pneumoniae* infections. In Emerging Infections 5, W.M. Scheld, W.A. Craig ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 2001. 57-84.

50. Taylor-Robinson D, Ainsworth JG. Genital Mycoplasmas. In Sexually Transmitted Diseases. McGraw-Hill, New York. 1999.

51. Biscardi S, Larrot M, Marc E, Moulin F, Boutonnat-Faucher B. *Mycoplasma pneumoniae* and asthma in children. Clin Infect Dis. 2004; 8: 1341-1346.

52. Dybvig K, Voelker LL. Molecular biology of mycoplasmas. Annu Rev Microbiol. 1996; 50:25-57.

53. Baseman JB, Tully JG. Mycoplasmas: Sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. Emerg Infect Dis. 1997; 3: 21-32.

54. Bruder J, Godry RC, Taikei K, da Cunha AT. Characterization of *Mycoplasma penetrans* and *Mycoplasma fermentans* immune dominant proteins. Bras J Microbiol. 2005; 36: 237-242.

55. Fedorko DP, Emory DD, Frankllin M, Congdom D. Evaluation of rapid enzyme immunoassay system for serologic diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. Diagn Microbiol Dis. 1995; 23: 85-88.

56. Ainsworth JG, Clarke J, Goldin R, Taylor-Robinson D. Dissemined *Mycoplasma fermentans* in AIDS patients: several case reports. Int J Std AIDS. 2000; 11: 751-755.

57. Gilroy CB, Keat A, Taylor-Robinson D. The prevalence of *Mycoplasma fermentans* in patients with inflammatory arthritides. Rheumatology (Oxford). 2001; 40: 1355-1358.

58. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. 1983. Diario oficial de la Federación, México. (Consultado 17 de junio de 2012). Disponible en http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/rlgsmis.html.

59. Sidhu M.K., Rashidbaigi A., Testa D. and Lia M.J. Competitor internal standards for quantitative detection of mycoplasma DNA. FEMS Microbiol. Lett. 1995; 128: 207-211

60. Oppenhaimer J, Harold N. Pruebas cutáneas. Annals of Allergy, Asthma and Inmunology. 2006; 96(1): 6-12.

61. Dávila AG. Micoplasma en patología pulmonar pediátrica. Rev. Peru. Pediatr. 2007; 60 (2): 100-104.

62. S. Esposito et al. Importance of acute *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* infections in children with wheezing. Eur Respir J. 2000; 16: 1142-1146.

63. Newcomb D.C., Stokes P. Bugs and asthma. A different disease? Proc. Am. Thoracic Soc. 2009; 6: 266-271

64. Lieberman David, Lieberman Devora, Printz S., Yaakov B, Lazrovich Z., Ohana B., Friedman M.G., Dvoskin B., Leinonen M., Boldur I. Atypical pathogen infection in adults with acute exacerbation of bronchial asthma. Am. J. Resp. Crit. Care Med. 2002; 167: 407-410

65. Rottem S. Interaction of Mycoplasmas with host cells. Physiol. Rev. 2003; 83: 417-432

66. Medina J. l., Coalson J., Brooks E., Winter V., Chaparro A., Principe M., Kannan T., Baseman J., Dube P. *Mycoplasma pneumoniae* CARDS Toxin induces pulmonary eosinophilic and lymphocytic inflammation. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2012; 46 (6): 815-822.

67. Martin R. J., Wei Chu H., Honour J. M., Harbeck R. J. Airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness after *Mycoplasma pneumoniae* infection in a murine model. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2001; 24: 577-582

68. Block S, Hedrick J, Hammerschlag M, Cassell G, Craft J. *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in pediatric community-acquired pneumonia: comparative efficacy and safety of clarithromycin vs. erythromycin ethylsuccinate. Pediatr Infect Dis J. 1995; 14: 471-7.

69. Sutherland E., Martin R. Asthma and atypical bacterial infection. Chest. 2007 132: 1962-1966.

70. Hendrick D., Davies R., D´Souza M., Pepys J. An analysis of skin prick test reactions in 656 asthmatic patients. Thorax. 1975; 30(2): 2-8.

71. D´Amato G., Chatzigeorgiou G., Corsico R. *et al*. Evaluation of the prevalence of skin prick test positivity to Alternaria and Cladosporium in patients with suspected respiratory allergy. Allergy. 1997; 52: 711-716

72. Colaizy T, Kuforiji T, Sklar S, Petters M. PCR methods in clinical investigations of human ureaplasmas: a minireview. Mol Genet Metol. 2003; 80: 389-397.

73. Yoshida T, Maeda S, Deguchi T. Rapid detection of *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* organisms in genitourinary samples by PCR-microtiter plate hybridization assay. J Clin Microbiol. 2003; 41: 1850-1855

74. Principi N, Esposito S, Blasi F, Allegra L. Role of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in Children with Community-Acquired Lower Respiratory Tract Infections. Clin Infect Dis. 2001; 32: 1281-1289.

75. Waites K. New Concepts of *Mycoplasma pneumoniae* Infections In Children. Pediatr Pulmonol. 2003; 36: 267-78.

76. Ferwerda A, Moll H, De Groot R. Respiratory Tract Infections By *Mycoplasma pneumoniae* In Children: A Review Of Diagnostic And Therapeutic Measures. Eur J Pediatr. 2001; 160: 483-491.

77. Harris J, Kolokathis A, Campbell M, Cassell G, Hammerschlag M. Safety and efficacy of azithromycin in the treatment of community-acquired pneumonia in children. Pediatr Infect Dis J. 1998; 17: 865-871.

78. Lack G. Pediatric allergic rhinitis and comorbid disorders. J Allergy Clin Immmunol. 2001; 108(Suppl):S9-S15.

79. Pérez MJ. Alergenos intradomiciliarios y riesgo para el asma en niños. Rev Alergia Mex. 1998; 45: 1-2.

80. Cavazos GM, Guerrero NB, Ramírez AD. Comparative mites and cockroaches sensitization study in three cities of Mexico. Rev Alergia Mex. 2008; 55:234-239.

81. Juárez-Santiesteban M, López García A, Paz-Martínez D, Galindo-García A, Papaqui-Tapia S. Correlación entre prueba cutánea para *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Dermatophagoides farinae* en pacientes alérgicos del Hospital Universitario de Puebla. Alergia, Asma e inmunología Pediátricas. 2000; 9(3): 82-85.

82. Small P., Kim H. Allergic rhinitis. Allergy Asthma & Clin Immunol. 2011. 7(1): S3. .doi:10.1186/1710-1492-7-S1-S3

Anexos
Formato de carta consentimiento informado

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PACIENTE

Puebla, Puebla a _____ de _____

Nombre del paciente: _____ he entendido y comprendido la información que se me proporcionó con respecto a mi participación en el proyecto de investigación denominado: “Papel de los Micoplasmas en las exacerbaciones del asma y rinitis alérgica".

Mis dudas con respecto a dicha participación han sido respondidas de manera satisfactoria. Se me ha informado que los datos obtenidos en el estudio, serán publicados con fines científicos. Acepto participar en este estudio de investigación, donde proporcionaré de manera voluntaria diversas muestras biológicas.

_____

Firma del participante
(Padre o tutor)

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO INVESTIGADOR

Yo Dr. _____he explicado al paciente _____, el objetivo del proyecto de investigación, así como los procedimientos que se emplearán en la toma de muestras, también he contestado las dudas y preguntas del paciente involucrado en la investigación. Por último esta investigación se llevará a cabo bajo criterios éticos del estudio, aplicando el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud; Titulo Segundo; De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos; Capitulo I; Articulo 17; Categoría II Investigación con riesgo mínimo.

_____

Firma del investigador