



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**“Detección de *Micoplasmas spp.*, en población universitaria”**

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

**PRESENTA:**

MARÍA FERNANDA HERNÁNDEZ GUZMÁN

**DIRECTOR DE TESIS:**

D. C. JOSÉ ANTONIO RIVERA TAPIA



**DICIEMBRE 2023**

## **AGRADECIMIENTOS**

- A la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla** por haberme acobijado desde mi primer día como parte de la institución en la **Preparatoria Regional Enrique Cabrera Barroso** (2015-2018) hasta mi último día en la **Facultad de Ciencias Biológicas** (2018-2023).
  
- Al **Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (ICUAP)** por permitirme realizar mi Servicio Social, Práctica Profesional y proyecto de titulación en sus instalaciones.
  
- Al **Laboratorio de Micoplasmas del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (ICUAP)** por ser el lugar que me dio la oportunidad de realizar esta investigación.
  
- Al **D.C. José Antonio Rivera Tapia** por recibirme en el Laboratorio de Micoplasmas, por ser mi instructor durante este trabajo y por compartirme sus conocimientos, herramientas, apoyo y paciencia para que esta investigación fuera posible.
  
- A todos los alumnos de la universidad que me apoyaron al formar parte de esta investigación y por brindarme su confianza para ello.

## **DEDICATORIAS**

### **A MI FAMILIA**

Para ti mamita y papi, por criarme con los valores que hoy me definen y por su amor de padres que me ha permitido cumplir mis metas y sueños. Te agradezco mamita, Alberta, por brindarme tus palabras llenas de amor, darme tu consejo y enseñarme sobre el trabajo, la constancia y la paciencia. Te agradezco papi, Esteban, por cuidar de mi salud y bienestar, por darme tu consejo, por siempre prestar atención a mi educación y brindarme tu apoyo. A ambos, infinitas gracias por su esfuerzo, compañía, cuidado y confianza a lo largo del camino para llegar hasta aquí.

A mi hermana, Alejandra, a ti por cuidar de mi desde pequeña hasta ahora. Agradezco a la vida por poder compartir mis 23 de años contigo y a ti por brindarme tu apoyo, tu esfuerzo, tu cuidado y tu amor de hermana.

A mis mascotas, Siri, Chato, Lulo y Galleta, por recibirme con alegría cuando vuelvo a casa y crear lindos recuerdos.

Para toda mi familia por apoyarme y cuidarme a la distancia, y por siempre recibirme con amor cada vez que regreso a casa. Agradezco el esfuerzo que me han brindado en estos años y por la confianza que tienen en mí.

### **A MI MANADA**

Mónica, Renata, Jessica, Diana, Gloria, Leslie y Dafne para ustedes que han sido mi compañía desde la preparatoria hasta ahora. Estoy inmensamente agradecida con la vida de poner en mi camino amigas como ustedes. Me siento sumamente feliz de tenerlas cerca y también orgullosa por las mujeres que son ahora y por las que se convertirán.

### **A MIS AMIGUITOS Y COMPAÑEROS**

Para mis amiguitos Biomorritos, Palomí, Josesín, Fanny y Mary, con quienes compartí tiempo, desvelos, alegrías y preocupaciones a lo largo de esta etapa.

Agradezco por nuestra amistad, la confianza que tuvieron en mi y por hacer más ligero este camino. Me siento feliz por las personas que son y sumamente orgullosa por lo que hemos logrado y por los buenos biólogos que seremos.

A Julissita, para ti por aligerar este camino, por hacerme compañía, por compartir conmigo lo que me hace feliz y por hacerme sentir parte algo. Te agradezco por ser mi confidente, mi compañera de aventuras y de futuros viajes.

### **A MI NOVIO**

A ti por acompañarme en todas las etapas de este proceso y por reconfortarme en el camino. Te agradezco por compartir y celebrar mis alegrías y logros, cuidar de mi y hacer más sencilla mi vida. También, te doy las gracias por aligerar mis tristezas, preocupaciones y miedos.

El camino ha sido complicado, pero estamos trabajando en lograr nuestras metas, me siento feliz y orgullosa por nuestro esfuerzo.

*“Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: también es un niño colocado ante fenómenos naturales que lo impresionan como un cuento de hadas”*

*-Marie Curie-*

## ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	I
DEDICATORIAS.....	II
ÍNDICE GENERAL.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ABREVIATURAS.....	VIII
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1 Características generales de los micoplasmas.....	3
2.1.1 Morfología celular.....	3
2.1.2 Membrana.....	6
2.1.3 Genoma.....	6
2.1.4 Metabolismo .....	8
3. ANTECEDENTES.....	10
3.1 <i>Mycoplasma hominis</i> .....	11
3.2 <i>Mycoplasma genitalium</i> .....	12
3.3 <i>Mycoplasma fermentans</i> .....	12
3.4 <i>Mycoplasma primatum</i> .....	13
3.5 <i>Mycoplasma spermatophilum</i> .....	13
3.6 <i>Mycoplasma penetrans</i> .....	13
3.7 <i>Ureaplasma urealyticum</i> .....	13
4. JUSTIFICACIÓN.....	14
5. HIPÓTESIS.....	15
6. OBJETIVOS.....	15
6.1 Objetivo general.....	15

6.2 Objetivos específicos.....	15
7. METODOLOGÍA.....	16
7.1 Grupo de estudio.....	16
7.2 Cultivo microbiológico para <i>Mycoplasma spp.</i> .....	16
7.3 Cultivo microbiológico para <i>Ureaplasma spp.</i> .....	17
7.4 Extracción de ADN genómico de las muestras.....	17
7.5 Determinación de <i>Mycoplasma spp.</i> por PCR.....	17
7.6 Determinación de <i>Ureaplasma spp.</i> por PCR.....	18
7.7 Electroforesis en gel de agarosa.....	18
7.8 Análisis estadístico.....	19
8. RESULTADOS.....	19
8.1 Sujetos de estudio.....	19
8.2 Detección de <i>Mycoplasma spp.</i> y <i>Ureaplasma spp.</i> por medio de cultivo líquido.....	21
8.3 Detección de <i>Mycoplasma spp.</i> y <i>Ureaplasma spp.</i> por medio de cultivo sólido.....	23
8.4 Detección de <i>Mycoplasma spp.</i> y <i>Ureaplasma spp.</i> por PCR.....	24
8.5 Comparación de la detección de <i>Mycoplasma spp.</i> y <i>Ureaplasma spp.</i> entre hombres y mujeres.....	26
8.6 Asociación de las variables con la detección de <i>Mycoplasma spp.</i> .....	27
8.7 Asociación de las variables con la detección de <i>Ureaplasma spp.</i> .....	28
9. DISCUSIÓN.....	29
10. CONCLUSIONES.....	39
11. PERSPECTIVAS.....	40
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
ANEXOS.....	52

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Comparación del tamaño del genoma de micoplasmas y el de otras bacterias.....	7
<b>Tabla 2.</b> Sitios primarios de colonización y sustrato metabólico de micoplasmas.....	8
<b>Tabla 3.</b> Posible papel etiológico de micoplasmas en diferentes enfermedades.....	10
<b>Tabla 4.</b> Resultados de la detección de <i>Mycoplasma spp.</i> por métodos microbiológicos y moleculares en el grupo de estudio.....	26
<b>Tabla 5.</b> Resultados de la detección de <i>Ureaplasma spp.</i> por métodos microbiológicos y moleculares en el grupo de estudio.....	26
<b>Tabla 6.</b> Comparación de la incidencia de <i>Mycoplasma spp.</i> y <i>Ureaplasma spp.</i> entre hombres y mujeres.....	27
<b>Tabla 7.</b> Coeficientes de las variables que tuvieron efecto sobre la probabilidad de ocurrencia de <i>Ureaplasma spp.</i> .....	29

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Micrografía electrónica de barrido de células de <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .....	4
<b>Figura 2.</b> Colonias de <i>Mycoplasma hominis</i> .....	5
<b>Figura 3.</b> Colonias de <i>Ureaplasma spp.</i> .....	5
<b>Figura 4.</b> Número de veces al mes que los participantes tienen relaciones sexuales de forma activa.....	20
<b>Figura 5.</b> Número de parejas sexuales que han tenido los participantes.....	21
<b>Figura 6.</b> Medio de cultivo líquido positivo para el género <i>Mycoplasma</i> .....	22
<b>Figura 7.</b> Medio de cultivo líquido positivo para el género <i>Ureaplasma</i> .....	22
<b>Figura 8.</b> Medio de cultivo sólido positivo para el género <i>Mycoplasma</i> .....	23
<b>Figura 9.</b> Medio de cultivo sólido positivo para el género <i>Ureaplasma</i> .....	23
<b>Figura 10.</b> Detección de <i>Mycoplasma spp.</i> por PCR.....	24
<b>Figura 11.</b> Detección de <i>Ureaplasma spp.</i> por PCR.....	25



## ABREVIATURAS

A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ATP	Adenosín trifosfato
C	Citocina
CA	Agalactia contagiosa
CD4+	Linfocitos T CD4+
°C	Grados Celcius
DIU	Dispositivo intrauterino
ETS	Enfermedades de transmisión sexual
FVU	Primera micción de orina
G	Guanina
gr	Gramo
ITS	Infecciones de transmisión sexual
K	Nucleótidos mixtos de G o T
Kb	Kilobases
LAMP	Amplificación isotérmica mediada por bucle
lb	Libra
MMP	Proteína de membrana de micoplasma
mL	Mililitro
mm	Milímetro
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PURE	Procedimiento de extracción ultrarrápida
R	Nucleótidos mixtos de A o G
rpm	Revoluciones por minuto
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
T	Tirosina

TIGR	Instituto de Investigación Genómica
U	Uracilo
UNG	Uretritis no gonocócica
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
V	Voltios
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VIH-1	Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1

## 1. RESUMEN

Los micoplasmas son bacterias a las que se les ha relacionado a enfermedades articulares y del aparato respiratorio y urogenital. Sin embargo, también forman parte de la microbiota genital normal en pacientes sanos. Debido a su importancia clínica, este trabajo tiene como objetivo estimar la incidencia de *Mycoplasma spp.* y *Ureaplasma spp.* en una población sana altamente reproductiva, así como determinar los posibles factores, relacionados a la vida sexual de los participantes, que pudieran predisponer a un diagnóstico positivo de estas bacterias.

Se colectaron muestras de orina de participantes universitarios sanos. La orina fue cultivada en el medio de cultivo Eaton sólido y líquido; para el diagnóstico de *Mycoplasma spp.* Para el diagnóstico de *Ureaplasma spp.* se realizó el mismo procedimiento en el medio de cultivo Urea. Las muestras también fueron procesadas por PCR como una forma complementaria al método microbiológico y comprobar resultados. Para determinar qué factores influyen en su incidencia, a los participantes se les aplicó una encuesta respecto a su estilo de vida, los resultados obtenidos de la encuesta fueron relacionados con los resultados obtenidos en el laboratorio a través de una regresión logística binaria.

La incidencia de *Mycoplasma spp.* en toda la población fue del 38.18%. No existe diferencia significativa entre el número de diagnósticos positivos para *Mycoplasma spp.* entre hombres (26.53%) y mujeres (36.36%) y no existe factor, de los aquí estudiados, que predisponga a un diagnóstico positivo para *Mycoplasma spp.* Para *Ureaplasma spp.* el diagnóstico fue del 32.25%. Las mujeres (47.72%) muestran una mayor predisposición a *Ureaplasma spp.*; el número de parejas sexuales, el consumo de alcohol y el género son factores que pueden predisponer a un diagnóstico positivo de esta bacteria.

## ABSTRACT

Mycoplasmas are bacteria that have been linked to joint, respiratory and urogenital diseases. However, they are also part of the normal genital microbiota in healthy

patients. Due to their clinical importance, this work aims to estimate the incidence of *Mycoplasma spp.* and *Ureaplasma spp.* in a highly reproductive healthy population, as well as to determine the possible factors, related to the sexual life of the participants, that could predispose to a positive diagnosis of these bacteria.

Urine samples were collected from healthy university participants. The urine was cultured in solid and liquid Eaton culture medium; for the diagnosis of *Mycoplasma spp.* For the diagnosis of *Ureaplasma spp.* the same procedure was performed in Urea culture medium. The samples were also processed by PCR as a complementary way to the microbiological method and check results. To determine which factors, influence its incidence, a lifestyle survey was administered to the participants, and the results obtained from the survey were related to the results obtained in the laboratory through a binary logistic regression.

The incidence of *Mycoplasma spp.* in the entire population was 38.18%. There is no significant difference between the number of positive diagnoses for *Mycoplasma spp.* between men (26.53%) and women (36.36%) and there is no factor, of those studied here, that predisposes to a positive diagnosis for *Mycoplasma spp.* For *Ureaplasma spp.* the diagnosis was 32.25%. Women (47.72%) showed a greater predisposition to *Ureaplasma spp.*; the number of sexual partners, alcohol consumption and gender are factors that may predispose to a positive diagnosis of this bacterium.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Características generales de los micoplasmas

Los micoplasmas son bacterias de tamaño reducido (0,2 – 0,3  $\mu\text{m}$ ) cuya principal característica es la ausencia de pared celular (Cazanave *et al.*, 2012), por lo que no se les puede aplicar la tinción de Gram. A pesar de esto, muchos taxónomos han clasificado a los micoplasmas y sus parientes dentro del filo *Firmicutes*, que consiste en bacterias Gram-positivas con bajo contenido de G+C como *Clostridium*, *Lactobacillus* y *Streptococcus* (Sethi *et al.*, 2012). Pertenecen a la clase *Mollicutes*, la cual puede encontrarse en humanos, animales, insectos y plantas. El orden *Mycoplasmatales* contiene una sola familia, *Mycoplasmataceae*, que comprende dos géneros: *Mycoplasma* y *Ureaplasma* (Sethi *et al.*, 2012).

La palabra *Mollicutes* proviene del latín *mollis* que significa suave, y *cutis* que significa piel, por lo que el término *mollicutes* hace referencia a una característica distintiva de los micoplasmas que es la falta de pared celular (Cedillo & Yañez, 2003).

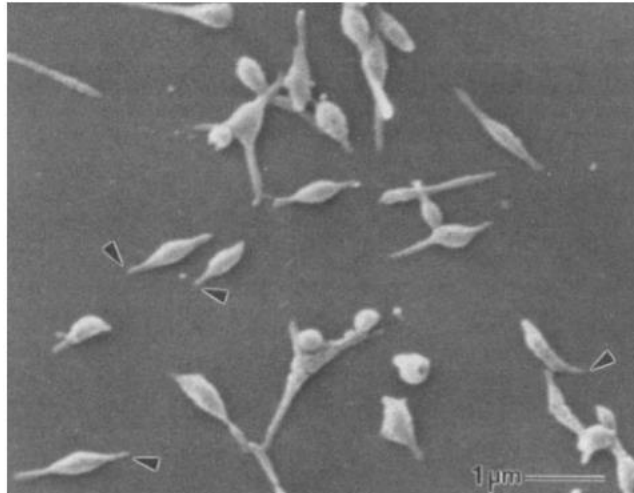
#### 2.1.1 Morfología celular

Los micoplasmas fueron considerados virus durante años, esto debido a su pequeño tamaño y a su capacidad de atravesar filtros que bloqueaban el paso de bacterias. Además, fueron confundidos con las formas L bacterianas ya que se asemejan en su morfología y en la peculiar forma de colonia de "huevo frito" (Razin & Hayflick, 2010), después de la obtención de datos genómicos se descartó esta idea.

Debido a la ausencia de pared celular, los mollicutes exhiben una variedad de entidades morfológicas (Figura 1), que incluyen células en forma de pera, células en forma de matraz con estructuras de punta terminal, filamentos de longitud variable (algunas ramificaciones), así como filamentos helicoidales (Razin & Hayflick, 2010).

El mantenimiento de sus diferentes formas en ausencia de una pared celular rígida sugiere que estos microorganismos poseen un citoesqueleto. Se han logrado

observar redes de hilos y varillas filamentosas en micoplasmas. Se cree que las estructuras similares al citoesqueleto funcionan en la modulación de la forma y participan en la división celular y en la motilidad deslizando de algunos micoplasmas (Razin & Hayflick, 2010).



**Figura 1.** Micrografía electrónica de barrido de células de *Mycoplasma pneumoniae*. Con estructuras de unión terminal indicadas por puntas de flecha (Tomado de Waites & Talkington, 2004).

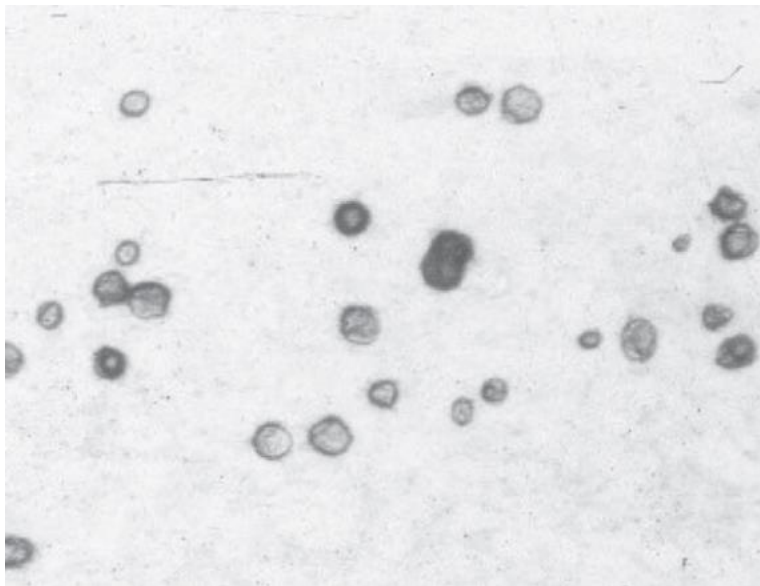
Los micoplasmas, son difíciles de cultivar y pueden pasar semanas e incluso algunos meses antes de que se muestre algún crecimiento en el medio de cultivo. Cuando se cultivan en medio sólido, penetran en la superficie del agar, las colonias (Figura 2) aparecen de color marrón y tienen un aspecto típico de "huevo frito" (tamaño: 200-400 µm): un núcleo granulado, oscuro y denso, bordeado por una zona delgada y clara (Sethi *et al.*, 2012). El género *Ureaplasma*, dado que producen colonias pequeñas (7-15 µm de diámetro), originalmente se denominaban cepas T (pequeñas), micoplasmas de cepa T o micoplasmas T (Kokkayil & Dhawan, 2015) y también muestran ese aspecto característico de huevo frito (Figura 3).

La falta de pared celular es responsable de una reacción de tinción de Gram-negativa y de la no susceptibilidad a los antibióticos β-lactámicos que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana (Taylor-Robinson, 1995; Sethi *et al.*, 2012), antibióticos como la penicilina y la vancomicina. Además, la ausencia de esta

estructura hace que tengan menos estabilidad osmótica y que tampoco cuenten con marcadores de superficie celular.



**Figura 2.** Colonias de *Mycoplasma hominis*. Con un aumento de 126X usando un estereomicroscopio (Tomado de Waites, 2006).



**Figura 3.** Colonias de *Ureaplasma spp.* Con un aumento de 126X usando un estereomicroscopio (Tomado de Waites, 2006).

### 2.1.2 Membrana

Se encuentran limitados únicamente por una membrana celular, por lo que estos microorganismos presentan formas pleomórficas. La membrana tiene 0,3-0,8  $\mu\text{m}$  de diámetro y está formada esencialmente por proteínas (60-70%) y lípidos (20-30%) (Razin & Hayflick, 2010).

Poseen una membrana que contiene esteroides, sustancias no halladas en bacterias ni virus, que le confiere soporte estructural (Pariasca, 2003). Por esto mismo, y su incapacidad de biosintetizar esteroides, los micoplasmas crecen en medios complejos los cuales deben ser ricos en nutrientes como suero de caballo o suero fetal de ternera como fuente de colesterol (Cedillo & Yañez, 2003).

La ausencia de pared celular hizo pensar que los micoplasmas son los organismos existentes más primitivos, representando a los descendientes de bacterias que existían antes del desarrollo de una pared celular. En la actualidad, gracias a datos de secuenciación de ARNr, se considera que han evolucionado a partir de bacterias Gram-positivas con pared por evolución degenerativa, por lo que esta historia parece incluir la pérdida de una pared celular. Maniloff (2002) sugirió que los micoplasmas surgieron de la rama filogenética *Streptococcus* hace unos 600 millones de años.

### 2.1.3 Genoma

El primer informe sobre la secuencia genómica completa de un micoplasma, fue publicado en octubre de 1995 por el equipo del Instituto de Investigación Genómica (TIGR) en Gaithersburg, Maryland, en colaboración con equipos de Johns Hopkins y de la Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill (Fraser *et al.*, 1995). Secuenciaron el genoma completo de *Mycoplasma genitalium*, esta especie cuenta con el genoma más pequeño (580 kb) conocido hasta el momento de un organismo autorreplicable. Los *Mollicutes* cuentan con el genoma más pequeño (Tabla 1) de las bacterias hasta ahora conocidas, sus genomas varían en tamaño desde 580 kb (*M. genitalium*) a 1358 kb (*Mycoplasma penetrans*) (Fraser *et al.*, 1995; Sasaki *et al.*, 2002; Halbedel & Stülke, 2007).



**Tabla 1.** Comparación del tamaño del genoma de micoplasmas y el de otras bacterias.

<b>Organismo</b>	<b>Tamaño del genoma (kb)</b>	<b>Contenido G+C (mol%)</b>
<b>Mollicutes</b>		
<i>Mycoplasma</i> especies	577-1,380	24-39
<i>Ureaplasma</i> especies	760-1,140	27-30
<i>Acholeplasma</i> especies	1,360-1,580	27-36
<i>Acholeplasma fórum</i>	870	27
<i>Acholeplasma entomophilum</i>	970	30
<i>Spiroplasma</i> especies	940-2,200	24-31
<b>Otras bacterias</b>		
<i>Chlamydia trachomatis</i>	1,450	43
<i>Campylobacter</i> especies	1,451-1,721	30-38
<i>Rickettsiella</i> especies	1,720-2,100	Desconocido
<i>Streptococcus</i> especies	1,700-2,300	34-46
<i>Haemophilus</i> especies	1,834-2,340	37-44
<i>Therzococcus celer</i>	1,890	57
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,800	34
<i>Clostridium perfringens</i>	3,600	25
<i>Bacillus subtilis</i>	4,188	43
<i>Escherichia coli</i>	4,700	50
<i>Bacillus cereus</i>	5,700	36
<i>Borrelia burgdorferi</i>	950 (L)*	26-30

\* Cromosoma lineal (Tomado de Bové, 1993).

En el código genético, se utiliza el codón UGA como un codón de terminación para los procesos de síntesis de proteínas. Yamao y colaboradores en 1985 reportaron que *Mycoplasma capricolum* codificaba al codón UGA para el aminoácido triptófano. Esta característica se encuentra en las mitocondrias y, ahora demostrado, en otros

*Mollicutes*. Se pensó que esta peculiar modificación del código genético era el resultado de un proceso de optimización en respuesta al bajo contenido de G/C genómico (Halbedel & Stülke, 2007)

#### 2.1.4 Metabolismo

A causa del pequeño genoma de los mollicutes, estos no poseen una amplia gama de actividades metabólicas y, las que tienen, están enfocadas principalmente en la generación de energía. Se ven limitados a una baja producción de ATP debido a que carecen de un ciclo completo de ácido tricarbóxico y no tienen quinonas ni citocromos, lo que descarta la vía de fosforilación oxidativa altamente eficaz como mecanismo generador de ATP (Pollack, 2002; Razin & Hayflick, 2010).

Esta clase de microorganismos se puede dividir en fermentadores y no fermentadores. Aquellos que no son fermentadores obtienen energía por la vía de la arginina dihidrolasa o por la degradación de urea (Tabla 2). La degradación de la arginina está acoplada a la generación equimolar de ATP por fosforilación a nivel de sustrato, una forma no demasiado efectiva de producir energía (Razin & Hayflick, 2010). Existe la hipótesis de que la hidrólisis de urea intracelular y la acumulación resultante de iones de amoníaco/amonio está acoplada a la síntesis de ATP a través de un mecanismo quimiosmótico (Razin, 1978). Los ureaplasmas son las únicas bacterias que requieren urea para su crecimiento.

**Tabla 2.** Sitios primarios de colonización y sustrato metabólico de micoplasmas.

Especies	Sitio primario de colonización		Sustrato metabólico		
	Orofarínge	Tracto urogenital	Glucosa	Arginina	Urea
<i>M. salivarium</i>	+	-	-	+	-
<i>M. orale</i>	+	-	-	+	-
<i>M. buccale</i>	+	-	-	+	-
<i>M. faucium</i>	+	-	-	+	-

<i>M. lipophilum</i>	+	-	-	+	-
<i>M. pneumoniae</i>	+	-	+	-	-
<i>M. hominis</i>	+	+	-	+	-
<i>M. genitalium</i>	+	+	+	-	-
<i>M. fermentans</i>	+	+	+	+	-
<i>M. primum</i>	-	+	-	+	-
<i>M. spermatophilum</i>	-	+	-	+	-
<i>M. pirum</i>	¿?	¿?	+	+	-
<i>M. penetrans</i>	-	+	+	+	-
<i>U. urealyticum</i>	+	+	-	-	+
<i>A. laidlawii</i>	+	-	+	-	-
<i>A. oculi</i>	¿?	-	+	-	-

\* *M*= *Mycoplasma*; *U*= *Ureaplasma*; *A*= *Acholeplasma* (Tomado de Tully, 1993).

Con respecto a las condiciones óptimas para el crecimiento de estos microorganismos, Rodríguez y colaboradores (1987) mencionan que, aunque la mayoría de los micoplasmas crecen a un pH de 7.4, el pH óptimo puede variar de 6 a 8.5 según el organismo en específico. Por esta razón, los medios de cultivo deben ser diseñados para cumplir con este requerimiento, por ejemplo, el medio de cultivo SP4 posee un pH de 7.5 y es considerado el mejor medio de uso general para el crecimiento de micoplasmas (Pérez *et al.*, 2007). Y en cuanto al crecimiento de ureaplasma, según Razin y colaboradores (1977) el medio debe mantener un pH entre 6.0 a 6.5.

Para poder detectar el crecimiento de estos microorganismos es importante agregar un indicador de pH al medio de cultivo, tal como el rojo de fenol, ya que los micoplasmas usualmente no producen turbidez en caldos de cultivo debido al pequeño tamaño de la célula (Pérez *et al.*, 2007). Los medios de cultivo deben ser incubados a 37°C, temperatura en la que estas bacterias crecen adecuadamente, y ser inspeccionados diariamente para detectar los cambios de color y turbidez (Pérez *et al.*, 2007).

El cultivo de micoplasmas requiere de un medio de cultivo base enriquecido con peptona, extracto de levadura y suero, todo esto suplementado con un sustrato metabólico (generalmente glucosa) (Pérez *et al.*, 2009). La mayoría de los micoplasmas metabolizan (fermentación) el ácido productor de azúcar provocando un cambio en el pH del medio, por lo que, hay un cambio de color de rojo a amarillo en el medio de cultivo.

El medio de cultivo Urea, que contiene urea y rojo de fenol, es utilizado para aislar *Ureaplasma spp.* y en el caso de un diagnóstico positivo, hay un cambio de color en el medio de cultivo, de rojo a fucsia. Estas bacterias producen la enzima ureasa, que hidroliza la urea a amoníaco, lo que causa el cambio a un pH alcalino y el cambio del indicador rojo de fenol (López-Ávila *et al.*, 2014).

### 3. ANTECEDENTES

El primer aislamiento de micoplasmas fue en 1898 por Nocard y Roux, quienes identificaron a *Mycoplasma mycoides* en casos de pleuroneumonía bovina. El primer micoplasma aislado de humanos (*Mycoplasma hominis*) se recuperó en 1937 en un paciente de sexo masculino con uretritis, y en 1938, en una mujer con absceso de la glándula de Bartholin (Ortiz, 2009).

El estudio de los micoplasmas en enfermedades humanas (Tabla 3) se ha centrado en el aparato respiratorio y urogenital, así como en enfermedades articulares, pero también se encuentran en personas sin algún tipo de padecimiento. De las 16 especies que han sido aisladas de seres humanos, siete han sido halladas en el tracto urogenital (Tabla 2). Y dentro del rubro de las infecciones transmitidas sexualmente, las especies *M. penetrans* y *Mycoplasma fermentans* tienen una mayor participación en pacientes que viven con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Taylor-Robinson & Furr, 1998; Ortiz, 2009).

**Tabla 3.** Posible papel etiológico de micoplasmas en diferentes enfermedades.

Enfermedad	Especies de micoplasma*	Evidencia de participación†
Uretritis no gonocócica (aguda)	<i>U. urealyticum</i>	++

	<i>M. genitalium</i>	+++
Uretritis no gonocócica (crónica)	<i>U. urealyticum</i>	+++
	<i>M. genitalium</i>	+++
Epididimitis	<i>U. urealyticum</i>	+
Artritis reactiva adquirida sexualmente	<i>U. urealyticum</i>	++
Artritis en hipogammaglobulinemia	<i>U. urealyticum</i>	++++
Vaginosis bacteriana	<i>M. hominis</i>	++++
	<i>U. urealyticum</i>	++
Enfermedad inflamatoria pélvica	<i>M. hominis</i>	+
	<i>M. genitalium</i>	++
Parto prematuro y aborto espontáneo	<i>M. hominis</i>	++
	<i>U. urealyticum</i>	++

---

\* U= *Ureaplasma*; M= *Mycoplasma*.

† ++++= muy fuerte; +++= fuerte; += moderado: += débil.

(Tomado de Taylor-Robinson & Furr, 1998).

### 3.1 *Mycoplasma hominis*

*M. hominis* es asociado a infecciones urogenitales, en particular a vaginosis bacteriana y uretritis no gonocócica, y algunas veces a bacteriemia, artritis, peritonitis y meningitis. La mayoría de los pacientes tienen factores predisponentes, que incluyen inmunosupresión, traumatismos, problemas respiratorios o posmanipulación y/o cirugía del tracto genitourinario (Posse *et al.*, 2017).

En mujeres, la colonización del tracto urogenital presenta una frecuencia del 21% al 54% y en hombres del 4% al 13% (Miranda *et al.*, 2005; Posse *et al.*, 2017).

Cuando ocurre la colonización de *M. hominis*, generalmente se debe al contacto cervical y vaginal durante el parto; los bebés nacidos por cesárea se colonizan con mucha menos frecuencia (Klein *et al.*, 1969; Taylor-Robinson, 2017) y su colonización en neonatos tiende a desaparecer después de 1-2 años. La readquisición de *M. hominis* en el tracto genital inferior depende entonces del

contacto sexual y, más concretamente, del número de parejas sexuales (McCormack *et al.*, 1972; McCormack *et al.*, 1973; Tully, 1993). Los individuos sexualmente maduros sin contacto sexual son colonizados con poca frecuencia.

### **3.2 *Mycoplasma genitalium***

Tully y colaboradores (1981) aislaron *Mycoplasma genitalium* por primera vez en 1980 en dos pacientes que presentaban uretritis no gonocócica (UNG).

Se han identificado factores de riesgo conductuales para la infección de este organismo en mujeres y hombres de entre 21 a 23 años: mayor número de parejas, edad más joven durante la primera relación sexual, tener una pareja con síntomas de infección, coinfección con otros patógenos de transmisión sexual como *Chlamydia trachomatis* (Hamasuna *et al.*, 2008; Sethi *et al.*, 2012) y por tener relaciones sexuales vaginales sin protección. Manhart y colaboradores (2007) demostraron que la prevalencia de *M. genitalium* aumentó en un 10% por cada pareja sexual adicional.

Su prevalencia en clínicas de enfermedades de transmisión sexual (ETS) varía del 13% al 29% en hombres y del 7% al 26% en mujeres (Manhart & Kay, 2010).

### **3.3 *Mycoplasma fermentans***

Los primeros aislamientos de *M. fermentans* (inicialmente denominados cepas G) se obtuvieron del tracto genital inferior de hombres y mujeres a principios de la década de 1950 (Ruiter & Wentholt, 1950; Ruiter & Wentholt, 1953). Parece que *M. fermentans* se aísla del tracto genital de menos del 1% de los adultos asintomáticos (Taylor-Robinson, 1989; Tully, 1993). Sin embargo, aún no se ha estudiado a detalle su papel en enfermedades del tracto urogenital.

*M. fermentans* ha sido detectado en el corazón, hígado, articulaciones, en el tracto gastrointestinal y en el sistema inmune y hematopoyético de pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). En un inicio, este hecho sugirió a esta especie como un microorganismo oportunista; sin embargo, su aislamiento de la sangre y orina de pacientes con SIDA, su detección por diferentes técnicas inmunológicas y de biología molecular en diversos tejidos de pacientes con SIDA

en diferentes estadios, la habilidad de la bacteria para estimular a linfocitos CD4+ y otras actividades inmunomoduladoras, así como la acción sinérgica en la que la bacteria junto con el VIH incrementan el efecto citopático sobre los linfocitos CD4+, sugieren que esta bacteria pudiera ser un cofactor en el SIDA (Cedillo & Yañez, 2003). Este sinergismo entre el SIDA con ciertos micoplasmas, sugiere a estos como cofactores que de alguna forma pudieran acelerar la enfermedad. Tal es el caso de la investigación realizada por Chowdhury y colaboradores (1990), estos autores encontraron que la proteína de membrana de micoplasma (MMP) aumentó la producción de VIH a partir de células MOLT-4 infectadas crónicamente por VIH.

### **3.4 *Mycoplasma primatum***

*Mycoplasma primatum*, se encuentra presente en primates no humanos, pero también se ha aislado del tracto urinario humano, de la uretra femenina en una autopsia (Thomsen, 1974). No está claro si su aislamiento poco frecuente se debe a su aparición poco frecuente o si se relaciona con sus exigentes requisitos nutricionales (Rawadi *et al.*, 1998).

### **3.5 *Mycoplasma spermatophilum***

Hill (1991) reportó el aislamiento de una especie de micoplasma nunca identificada en espermatozoides humanos, a esta se le denominó *Mycoplasma spermatophilum*. Estos se aislaron de los espermatozoides de cinco pacientes que acudían a una clínica de fecundación *in vitro*, existe sospecha de que este organismo causa infertilidad (Hill *et al.*, 1987; Rawadi *et al.*, 1998).

### **3.6 *Mycoplasma penetrans***

Lo y colaboradores (1991) aislaron varias cepas de una especie nueva de micoplasmas a partir de la orina de pacientes con SIDA, esta especie ha sido caracterizada y designada como *M. penetrans* (Lo *et al.*, 1992).

### **3.7 *Ureaplasma urealyticum***

*Ureaplasma* reside en el tracto urogenital y el tracto respiratorio. En los seres humanos, este género se transmite por contacto sexual; también puede transmitirse

de la madre a la descendencia de forma vertical en el útero o a través de fluidos corporales infectados en el momento del nacimiento (Schelonka & Waites, 2007; Kokkayil & Dhawan, 2015). Después de la pubertad, la colonización genital está relacionada con la actividad sexual.

Los ureaplasmas forman parte de la microbiota genital normal, pero se les ha implicado en resultados clínicos que incluyen, entre otros, uretritis no gonocócica, enfermedad inflamatoria pélvica, infertilidad, resultados adversos del embarazo, corioamnionitis y displasia broncopulmonar en recién nacidos (Waites & Schelonka, 2005; Paralanov *et al.*, 2012).

Entre el 40% y el 80% de las mujeres adultas sanas pueden albergar ureaplasmas en el cuello uterino o la vagina. Su ocurrencia es algo menor en el tracto urogenital inferior de hombres sanos (aproximadamente 20% - 29%) (Kong *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2010; Paralanov *et al.*, 2012).

Se piensa que *Ureaplasma urealyticum* juegan un papel en la infertilidad masculina, sin embargo, algunos investigadores no han encontrado ninguna relación entre esta especie y la alteración del semen. Autores han informado que la presencia de *U. urealyticum* en el semen, se relacionó con una disminución en la concentración de espermatozoides (Upadhyaya *et al.*, 1984; Naessens *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 2006), en la motilidad (Naessens *et al.*, 1986; De Jong *et al.*, 1990) y/o en la morfología (Xu *et al.*, 1997; Gdoura *et al.*, 2007).

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

Los micoplasmas se encuentran colonizando una gran variedad de organismos, incluyendo al humano. Muchas especies de micoplasmas han sido relacionadas a diferentes enfermedades como artritis, infecciones orofaríngeas y del tracto urogenital, como uretritis no gonocócica y vaginosis bacteriana, por mencionar algunas, e incluso se les ha relacionado con el SIDA. A pesar de ser considerados comensales y formar parte de la microbiota genital normal del humano, las investigaciones se han centrado en el estudio de estos microorganismos y su papel



con diferentes enfermedades, pero se conoce poco, en comparación con otras bacterias, sobre su papel y frecuencia en pacientes sanos.

Se ha visto una tendencia en el aumento de la colonización de estos organismos en el tracto urogenital en relación con un mayor número de parejas sexuales, una edad más temprana en el comienzo de la vida sexual, el uso de preservativos y con la coinfección con otros microorganismos de transmisión sexual.

El rango de edad de la población universitaria de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla oscila entre los 17 y los 26 años, una edad altamente reproductiva y sin tendencia a algún tipo de enfermedad. Con base a lo anterior, el presente trabajo busca contribuir ampliando el conocimiento de la prevalencia de micoplasmas y ureaplasmas en una población joven sana.

## **5. HIPÓTESIS**

La presencia de los micoplasmas es mayor en universitarios con una vida sexual activa, un mayor número de parejas sexuales y que iniciaron su vida sexual a una temprana edad.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo general**

Detección de micoplasmas en una población universitaria sana.

### **6.2 Objetivos específicos**

1. Identificar *Mycoplasma spp.* y *Ureaplasma spp.* en una población universitaria sana por métodos microbiológicos específicos y por la amplificación de ADN.
2. Comparar el porcentaje de muestras positivas a *Mycoplasma spp.* y *Ureaplasma spp.* entre hombres y mujeres.
3. Determinar si existe relación entre la positividad de aislamientos de *Mycoplasma spp.* y *Ureaplasma spp.* y la vida sexual de los participantes.

4. Determinar si existe relación entre la positividad de aislamientos de *Mycoplasma spp.* y *Ureaplasma spp.* en los participantes y el consumo alcohol y tabaco.

## **7. METODOLOGÍA**

### **7.1 Grupo de estudio**

Se colectaron 100 muestras de orina de alumnos voluntarios de diferentes facultades de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Únicamente se tomaron muestras de alumnos clínicamente sanos y que no hubieran consumido algún tipo de antibiótico por lo menos tres meses antes de la toma de la muestra, y en el caso de las mujeres, que no estuvieran en su periodo (criterios de inclusión).

A cada participante se le aplicó una encuesta anónima (Anexo 1), para conocer su estado general de salud, obtener información sobre su vida sexual y de posibles factores que pudieran relacionarse con un diagnóstico positivo de *Mycoplasma spp.* y *Ureaplasma spp.* Además, cada participante firmó una carta de consentimiento informado (Anexo 2) donde se le dio a conocer el uso de su muestra, garantizando la privacidad y anonimato de sus datos.

### **7.2 Cultivo microbiológico para *Mycoplasma spp.***

Para el procesamiento de las muestras, en las primeras 24 horas de la colecta, se cultivaron 500µL de la orina en 500µL de caldo Eaton con dextrosa al 0.5%, dializado de levadura al 10% y suero de caballo al 25% (Anexo 3). Los cultivos se incubaron a 37°C durante un periodo de dos a cinco días, el tiempo de incubación cambia según el vire del indicador de rojo de fenol (de rojo a amarillo). Después de incubar los medios líquidos, las muestras se guardaron en tubos Eppendorf y se conservaron a -75°C para su futuro uso.

De igual manera, se cultivaron 5µL de la muestra de orina en agar Eaton con las mismas características que el caldo Eaton (Anexo 4). Las muestras fueron cultivadas de manera directa por gravedad. Las placas se incubaron a 37°C durante un periodo de dos a cinco días para posteriormente ser observadas bajo el

microscopio estereoscópico en búsqueda de colonias en forma de huevo frito, forma característica que presentan las colonias.

### **7.3 Cultivo microbiológico para *Ureaplasma spp.***

Al igual que para el cultivo de micoplasma, para el aislamiento de ureplasma las muestras se procesaron en las primeras 24 horas de la colecta. Se cultivaron 500µL de la orina en 500µL de caldo Urea con urea al 10%, dializado de levadura al 10% y suero de caballo al 25% (Anexo 5). Los cultivos se incubaron a 37°C durante un periodo de dos a cinco días, el tiempo de incubación cambia según el vire del indicador de rojo de fenol (de rojo a fucsia). Después de incubar los medios, las muestras se guardaron en tubos Eppendorf y se conservaron a -75°C para su futuro uso.

Así mismo, se cultivaron 5µL de la muestra de orina en agar Urea con las mismas características que el caldo Urea (Anexo 6). Las muestras se cultivaron de manera directa por gravedad. Las placas se incubaron a 37°C durante dos a cinco días para posteriormente ser observadas bajo el microscopio estereoscópico en búsqueda de colonias de ureaplasmas.

### **7.4 Extracción de ADN genómico de las muestras**

Para la extracción de ADN genómico de las 100 muestras colectadas, se utilizó el kit comercial Quick-DNA™ Miniprep Kit de la marca ZYMO RESEARCH. Se siguieron las instrucciones proporcionadas por el proveedor (Anexo 7).

Una vez realizada la extracción genómica de las muestras, estas se conservaron a -20°C.

### **7.5 Determinación de *Mycoplasma spp.* por PCR**

Los primers que se utilizaron para la detección por PCR del género *Mycoplasma* corresponden a una secuencia (301 pb) altamente conservada del gen 16s ARNr de los micoplasmas. La secuencia de los primers es: AR1 (5' ATG RGG RTG CGG CGT ATT AG 3') (sentido) y AR2 (5' CKG CTG GCA CAT AGT TAG CCRT 3') (antisentido). El símbolo K representa los nucleótidos mixtos de G y T, y el R representa A y G (Rashidbaigi *et al.*, 1995).

La mezcla de reacción, para un volumen de 50µL por cada muestra, estuvo compuesta por 25µL DreamTaq Green PCR Master Mix (2X), 17µL de agua libre de nucleasas, 1.5µL del primer AR1, 1.5µL del primer AR2 y 5µL de la extracción genómica de la muestra.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador programable TECHNE TC-412. Las condiciones de reacción fueron: una desnaturalización inicial a 95°C durante cinco minutos, seguido de 40 ciclos (95°C por un minuto, 50°C por un minuto y 72°C por un minuto) y una extensión final a 72°C por cinco minutos.

### **7.6 Determinación de *Ureaplasma spp.* por PCR**

Los primers que se utilizaron para la detección por PCR del género *Ureaplasma* son descritos por Blanchard y colaboradores (1993), estos primers corresponden a la secuencia de nucleótidos de los genes estructurales de la ureasa (429 pb) de este microorganismo. La secuencia de los primers es: U5 (5'-CAA TCT GCT CGT GAA GTA TTAC-3') (sentido) y U4 (5'-ACGA CGT CCA TAA GCA ACT-3') (antisentido).

La mezcla de reacción, para un volumen de 50µL por cada muestra, estuvo compuesta por 25µL DreamTaq Green PCR Master Mix (2X), 17µL de agua libre de nucleasas, 1.5µL del primer U4, 1.5µL del primer U5 y 5µL de la extracción genómica de la muestra.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en el mismo termociclador utilizado para la detección del género *Mycoplasma* por PCR. En este caso, las condiciones de reacción fueron: una desnaturalización inicial a 94°C durante cuatro minutos, seguido de 40 ciclos (95°C por 20 segundos, 62°C por un minuto y 72°C por un minuto) y una extensión final a 72°C por cinco minutos.

### **7.7 Electroforesis en gel de agarosa**

Los productos amplificados se analizaron por electroforesis a través de un gel de agarosa al 2% utilizando para su preparación buffer TAE 1X. La electroforesis se llevó a cabo a 70 voltios (V) durante 40 minutos.

En cada pozo se le agregaron 6µL de la muestra amplificada, 5µL de GelRed Nucleic Acid Gel Stain y 3µL TriTrack DNA Loading Dye (6X). Se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler® 1000 bp Plus DNA Ladder para determinar el tamaño del fragmento de ADN amplificado.

El gel de agarosa fue visualizado en un fotodocumentador. Las muestras que fueron positivas a *Mycoplasma spp.* mostraron un peso molecular de 301 pb y un peso molecular de 429 pb en el caso de ser positivas a *Ureaplasma spp.*

## **7.8 Análisis estadístico**

Se comparó el diagnóstico de *Mycoplasma spp.* únicamente entre hombres y mujeres, para esto se realizó la prueba chi-cuadrado en el programa estadístico SPSS versión 29.0.1.0. Se ocuparon los mismos criterios, pruebas y programas para el análisis del diagnóstico de *Ureaplasma spp.*

Para determinar qué factores, relacionados con la vida sexual de los participantes, predispusieron a la incidencia y positividad de estos microorganismos, se empleó el modelo de análisis de regresión logística binaria con el programa estadístico SPSS versión 29.0.1.0.

## **8. RESULTADOS**

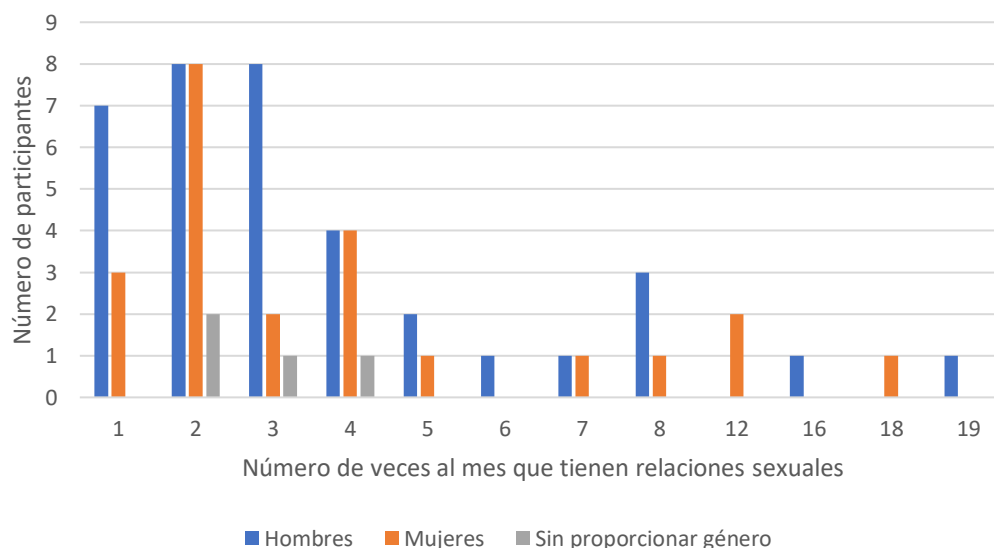
### **8.1 Sujetos de estudio**

En este estudio se incluyeron a 100 estudiantes de licenciatura de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla durante el periodo de Agosto 2022 a Marzo 2023. Los participantes cumplieron con los criterios de inclusión para el estudio y autorizaron el uso de sus muestras a través del consentimiento informado que se les otorgó.

Del total de los participantes, 49 fueron hombres y 44 mujeres, el resto de los participantes, siete, no proporcionó su género. La edad promedio del primer grupo fue de 20.55 años, con una edad mínima de 17 años y la máxima de 26 años. La edad promedio de las mujeres fue de 20.81 años, con una edad mínima de 18 años y una máxima de 29 años. La edad promedio del grupo que no proporcionó su género fue de 20.57 años, su edad mínima fue de 18 años y la máxima de 27 años.

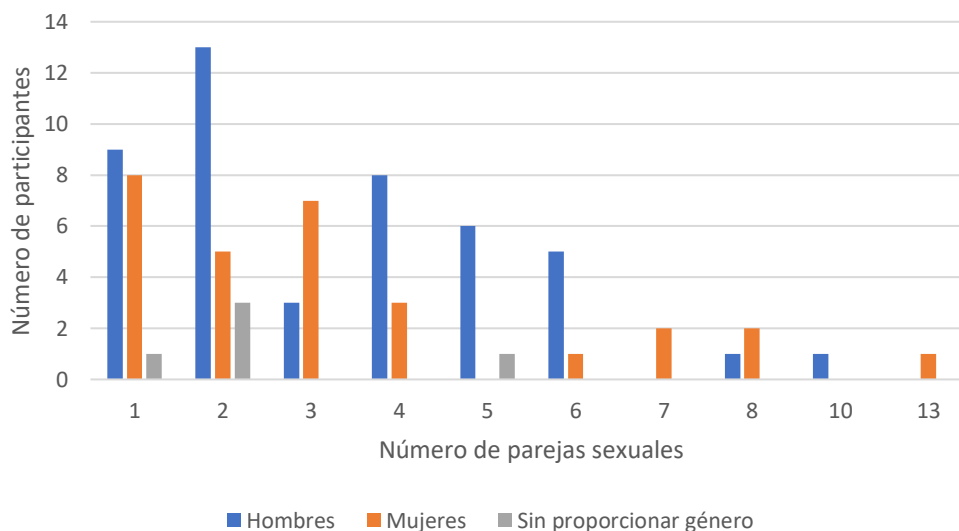
Del grupo de hombres, treinta y cinco refirieron tener una vida sexual activa, 16.91 años fue la edad promedio en la que esta dio inicio, la edad mínima fue a los 13 años y la máxima a los 21 años. Veintitrés mujeres respondieron que mantienen una vida sexual activa, la edad promedio a la que dieron inicio de esta fue a los 17.14 años, este grupo respondió que la edad mínima a la que comenzó su vida sexual fue a los 13 años y la máxima fue a los 23 años. De los participantes que no proporcionaron su género, tres mantienen una vida sexual activa, la edad promedio del inicio de esta fue a los 17 años, y la edad mínima fue a los 15 años y la máxima a los 18 años.

De los 61 participantes que refirieron tener una vida sexual activa, 18 mencionaron que tienen relaciones sexuales dos veces al mes (Figura 4), de estos 18 participantes, ocho son hombres, ocho son mujeres y dos no proporcionaron su género. Once participantes remitieron tener relaciones sexuales tres veces al mes, de estos, ocho son hombres, dos son mujeres y un participante que no proporcionó su género. De los 10 participantes que aludieron tener relaciones sexuales una vez al mes, siete son hombres y tres son mujeres. Un hombre práctica esta actividad 16 veces al mes, otro 19 veces y una mujer 18 veces.



**Figura 4.** Número de veces al mes que los participantes tienen relaciones sexuales de forma activa.

Del total de los participantes, 18 participantes respondieron haber tenido una pareja sexual (Figura 5), nueve de ellos son hombres, ocho son mujeres y uno de ellos pertenece al grupo que no proporcionó su género. Únicamente 21 participantes han tenido dos parejas sexuales, 13 son hombres, cinco son mujeres y tres son participantes que no proporcionaron su género. Solamente, un participante hombre refirió haber tenido 10 parejas sexuales y una participante mujer, 13 parejas.



**Figura 5.** Número de parejas sexuales que han tenido los participantes.

De todos los participantes, 76 usan algún preservativo de barrera, de estos, 44 son hombres, 27 son mujeres y cinco son participantes que no proporcionaron su género. En la encuesta, 14 participantes respondieron que no usan algún preservativo de barrera, de este grupo, tres son hombres y 11 son mujeres.

Sesenta y uno participantes del total, señalaron el consumo de alcohol, de estos, 27 son hombres, 28 son mujeres y seis pertenecen al grupo que no proporcionó su género.

Del total de participantes que respondieron la encuesta, 12 mencionaron el consumo de tabaco, de los cuales, 11 son hombres y una mujer.

## 8.2 Detección de *Mycoplasma spp.* y *Ureaplasma spp.* por medio de cultivo líquido

Se inocularon 500µL de orina de cada muestra en 500µL de caldo Eaton, este

mismo procedimiento se llevó a cabo en caldo Urea. Aquellas muestras que viraron de rojo a amarillo (Figura 6) en el medio Eaton se consideraron como positivas para el género *Mycoplasma* y las que viraron de rojo a fucsia (Figura 7) fueron positivas para *Ureaplasma*.



**Figura 6.** Medio de cultivo líquido positivo para el género *Mycoplasma*.



**Figura 7.** Medio de cultivo líquido positivo para el género *Ureaplasma*.

De las 37 muestras que fueron positivas al género *Mycoplasma*, 21 pertenecen a hombres, 15 a mujeres y una a quien no proporcionó su género (Tabla 4). Sesenta y tres de las muestras fueron negativas a este género.

Del total de las muestras proporcionadas por hombres, el 42.85% (21/49) fue positivo a micoplasmas. El 34.09% (15/44) de las muestras proporcionadas por mujeres también dieron positivo a este género. Y, el 14.28% (1/7) de quienes no revelaron su género viraron a amarillo.

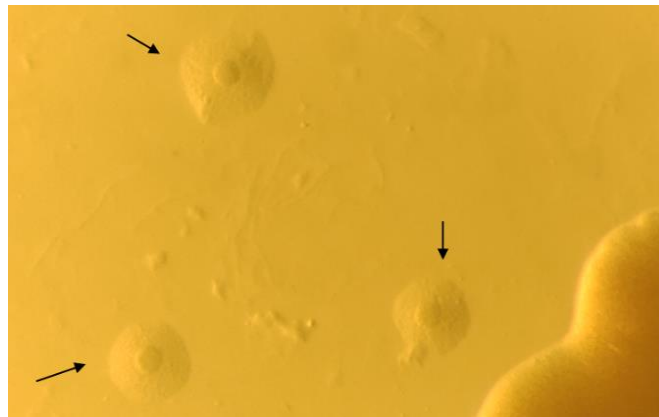
En el caso del caldo Urea, de las 100 muestras, 62 dieron positivas al género *Ureaplasma*. Del total de las muestras, 26 de las muestras que viraron a fucsia pertenecen a hombres, 31 a mujeres y cinco a quien no proporcionó su género (Tabla 5). Treinta y ocho muestras fueron negativas a este género.



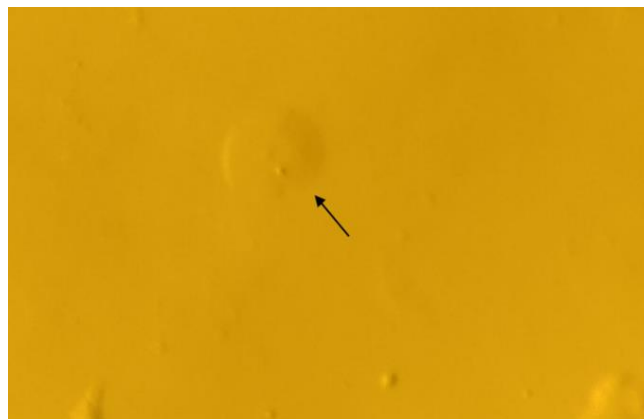
Del total de las muestras proporcionadas por hombres, el 53.06% (26/49) fueron positivas a ureaplasma. El 70.45% (31/44) de las muestras proporcionadas por mujeres dieron positivo a dicho género. Y, el 71.42% (5/7) de quienes no revelaron su género viraron a fucsia.

### 8.3 Detección de *Mycoplasma spp.* y *Ureaplasma spp.* por medio de cultivo sólido

Se sembraron 5µL de la muestra de orina de manera directa por gravedad en agar Eaton, este mismo procedimiento se llevó a cabo en agar Urea. Aquellos cultivos que en el agar Eaton (Figura 8) y agar Urea (Figura 9) mostraron crecimiento de colonias en forma de huevo frito se consideraron como positivas.



**Figura 8.** Medio de cultivo sólido positivo para el género *Mycoplasma*. Las flechas indican las colonias de micoplasmas.



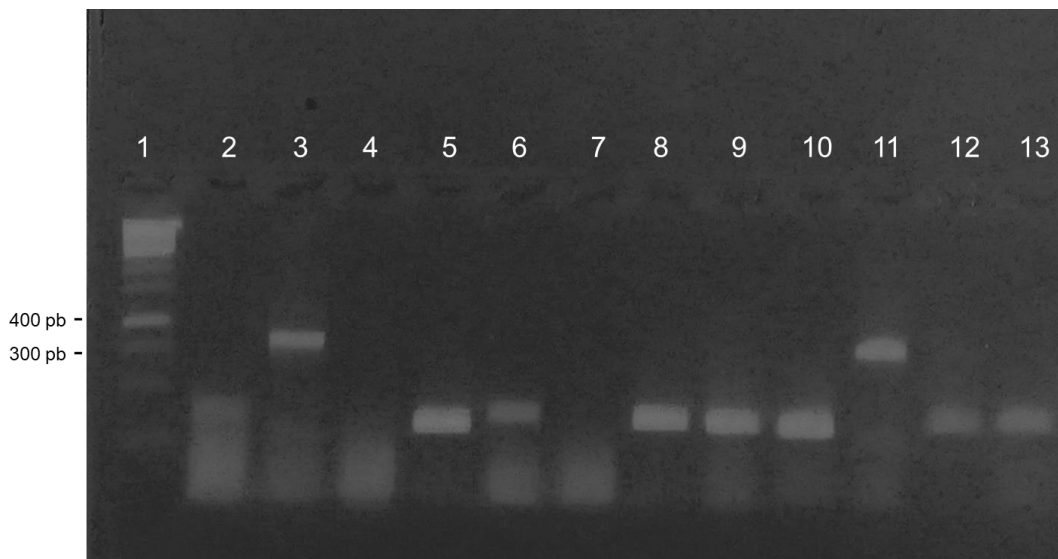
**Figura 9.** Medio de cultivo sólido positivo para el género *Ureaplasma*. Las flechas indican las colonias de ureaplasmas.

De las 25 muestras que mostraron crecimiento de colonias de micoplasmas, 12 pertenecen a hombres, 12 a mujeres y una a quien no proporcionó su género (Tabla 4). Setenta y cinco de las muestras dieron negativas al género. Del total de las muestras proporcionadas por hombres, el 24.48% (12/49) mostró el crecimiento en forma de huevo frito de los micoplasmas. El 26.08% (12/46) de las muestras proporcionadas por mujeres fueron positivas al género. Y, el 14.28% (1/7) de las muestras de quienes no revelaron su género también presentaron este crecimiento.

En el caso del medio sólido Urea, de las 100 muestras, 30 mostraron el crecimiento de colonias de *Ureaplasma*. Nueve pertenecen a hombres, 19 a mujeres y dos a quien no proporcionó su género (Tabla 5). Sesenta de las muestras fueron negativas al género. Del total de las muestras proporcionadas por hombres, el 18.36% (9/49) mostró crecimiento de colonias correspondientes al género *Ureaplasma*. El 43.18% (19/44) de las muestras proporcionadas por mujeres dieron positivo a dicho género. Y, el 28.57% (2/7) de quienes no revelaron su género presentaron este crecimiento.

#### 8.4 Detección de *Mycoplasma spp.* y *Ureaplasma spp.* por PCR

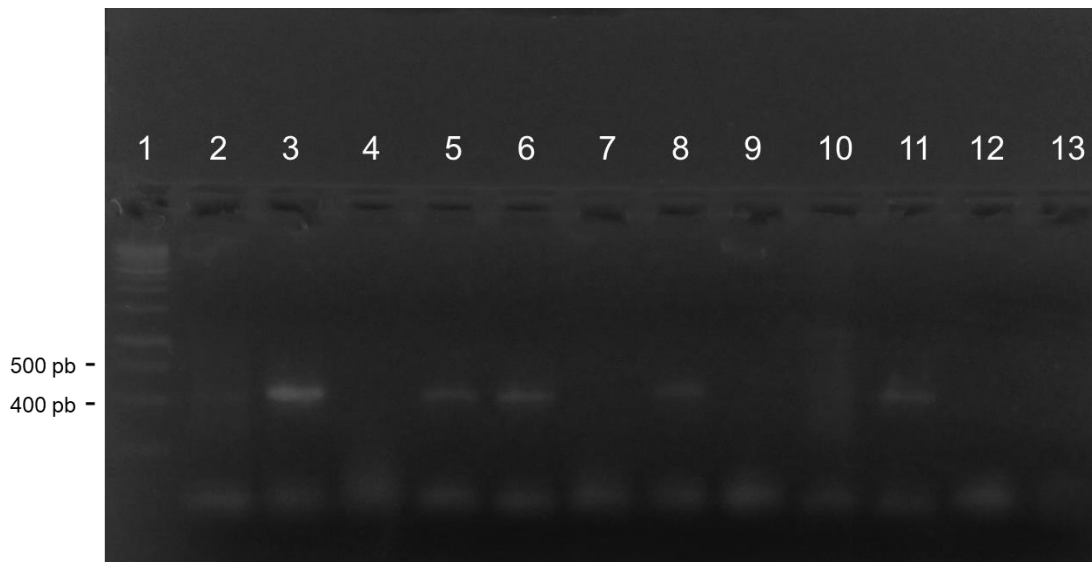
Se consideró un fragmento de ADN de 301 pb, el cual corresponde a una secuencia altamente conservada del gen 16s ARNr de los micoplasmas, para identificar al género *Mycoplasma* en todas las muestras obtenidas (Figura 10).



**Figura 10.** Detección de *Mycoplasma spp.* por PCR. Gel de agarosa al 2%, el primer pocillo contiene el marcador de peso molecular de 1 kb, en los pocillos 3 y

11 se observa un amplificado positivo a 301 pb, correspondiente al género *Mycoplasma*.

Para el diagnóstico del género *Ureaplasma*, se consideró un fragmento de ADN de 429 pb que pertenece a la secuencia de nucleótidos de los genes estructurales de la ureasa de este microorganismo (Figura 11).



**Figura 11.** Detección de *Ureaplasma spp.* por PCR. Gel de agarosa al 2%, el primer pocillo contiene el marcador de peso molecular de 1 kb, en los pocillos 3, 5, 6, 8 y 11 se observa un amplificado positivo a 429 pb, correspondiente al género *Ureaplasma*.

De todas las muestras proporcionadas por los participantes, siete fueron positivas en el diagnóstico por PCR al género *Mycoplasma*. De estas siete muestras positivas, una pertenece a un hombre y seis a mujeres (Tabla 4). Las noventa y tres muestras restantes fueron negativas a este género.

Del total de las muestras proporcionadas por hombres, el 2.04% (1/49) fueron positivas a *Mycoplasma spp.* El 13.63% (6/44) de las muestras proporcionadas por mujeres también fueron positivas a este género.

Como resultado de la amplificación por PCR para identificar al género *Ureaplasma* en todas las muestras proporcionadas por los participantes, se obtuvo que, siete de estas fueron positivas en el diagnóstico. De las muestras positivas, cinco pertenecen

a mujeres y dos a participantes de los que se desconoce su género (Tabla 5). Las noventa y tres muestras restantes fueron negativas a *Ureaplasma spp.*

El 11.36% (5/44) de las muestras proporcionadas por mujeres fueron positivas a este género. Y, el 28.57% (2/7) de quienes no revelaron su género mostraron el mismo resultado.

**Tabla 4.** Resultados de la detección de *Mycoplasma spp.* por métodos microbiológicos y moleculares en el grupo de estudio.

	Métodos microbiológicos		Método molecular
	Caldo Eaton	Agar Eaton	PCR
<b>Hombres</b>	21	12	1
<b>Mujeres</b>	15	12	6
<b>Género desconocido</b>	1	1	0

**Tabla 5.** Resultados de la detección de *Ureaplasma spp.* por métodos microbiológicos y moleculares en el grupo de estudio.

	Métodos microbiológicos		Método molecular
	Caldo Urea	Agar Urea	PCR
<b>Hombres</b>	26	9	0
<b>Mujeres</b>	31	19	5
<b>Género desconocido</b>	5	2	2

### 8.5 Comparación de la detección de *Mycoplasma spp.* y *Ureaplasma spp.* entre hombres y mujeres

Se unificaron los resultados del diagnóstico de ambas bacterias debido a las diferencias en los resultados de su detección por medio de métodos microbiológicos y moleculares. Se consideraron positivas aquellas muestras que en el medio de

cultivo sólido mostraron crecimiento de colonias y/o que fueron positivas por PCR; y también aquellas en las que el medio de cultivo líquido fue positivo junto con medio de cultivo sólido.

Para la comparación de la incidencia de *Mycoplasma spp.*, y *Ureaplasma spp.*, solo se consideraron a hombres y mujeres (Tabla 6), por lo que únicamente se tomaron en cuenta 93 participantes.

**Tabla 6.** Comparación de la incidencia de *Mycoplasma spp.* y *Ureaplasma spp.* entre hombres y mujeres.

	Participantes n (%)		p*
	Hombres (n= 49)	Mujeres (n= 44)	
<b><i>Mycoplasma spp.</i></b>	13 (26.53%)	16 (36.36%)	0.425
<b><i>Ureaplasma spp.</i></b>	9 (18.36%)	21 (47.72%)	0.002**

\* Valor de p para la prueba de chi-cuadro ( $X^2$ ).

\*\* Valor significativo de p ( $p < 0.05$ ).

El 31.18% (29/93) de los participantes fueron diagnosticados con *Mycoplasma spp.* De las muestras proporcionadas por hombres, el 26.53% (13/49) fueron positivas y el 36.36% (16/44) del total de las mujeres también fueron positivas a este mismo género. No se mostró una diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) en la presencia de esta bacteria entre ambos grupos (Tabla 6).

En el caso de *Ureaplasma spp.*, el 32.25% (30/93) de los participantes fueron positivos para este género. De las muestras proporcionadas por hombres, el 18.36% (9/49) fueron positivas y el 47.72% (21/44) del total de las mujeres también fueron positivas a este mismo género. En este caso, las mujeres fueron las que tuvieron un mayor diagnóstico positivo a *Ureaplasma spp.*, mostrando una diferencia significativa ( $p= 0.002$ ) en la presencia de esta bacteria entre ambos grupos (Tabla 6).

### **8.6 Asociación de las variables con la detección de *Mycoplasma spp.***

Se realizó un análisis de regresión logística (método hacia atrás: razón de

verosimilitud) para determinar el papel de las variables en la incidencia de *Mycoplasma spp.* en los participantes.

Se tomó la variable diagnóstica de *Mycoplasma spp.* (0= Negativo, 1= Positivo) como variable dependiente; las variables predictoras fueron, si los participantes son o no sexualmente activos, la edad a la que iniciaron su vida sexual, el número de veces que tienen relaciones sexuales al mes, el número de parejas sexuales que han tenido, si usan o no algún preservativo de barrera, si consumen o no alcohol y tabaco y el género de los participantes. Para ello, solo se consideraron las muestras de los participantes que proporcionaron su género.

El modelo no fue significativo ( $X^2 = -2.324$ ,  $gl = 1$ ,  $p = 0.127$ ). El modelo explicó el 00.0%<sub>Nagelkerke</sub> del cambio de la variable dependiente (diagnóstico de *Mycoplasma spp.*) ( $r^2 = 0.000$ ).

Ninguna de las variables tuvo efecto sobre la probabilidad de incidencia de *Mycoplasma spp.* en los participantes ( $p > 0.05$ ) (para ver a detalle los coeficientes de las variables evaluadas sobre la ocurrencia de *Mycoplasma spp.* ver el Anexo 8).

### **8.7 Asociación de las variables con la detección de *Ureaplasma spp.***

En el caso de la asociación de estas mismas variables con la incidencia de *Ureaplasma spp.* en los participantes, el análisis se realizó por el mismo método (hacia atrás: razón de verosimilitud). De igual manera, se tomó la variable diagnóstica de *Ureaplasma spp.* (0= Negativo, 1= Positivo) como variable dependiente; las variables predictoras fueron las mismas que se utilizaron para el género *Mycoplasma*. Igualmente, solo se consideraron las muestras de los participantes que proporcionaron su género.

El modelo resultó significativamente confiable ( $X^2 = 16.598$ ,  $gl = 4$ ,  $p = 0.002$ ). El modelo explicó el 27.8%<sub>Nagelkerke</sub> del cambio de la variable dependiente (diagnóstico de *Ureaplasma spp.*) ( $r^2 = 0.278$ ).

Únicamente tres variables tuvieron efecto sobre la probabilidad de ocurrencia de *Ureaplasma spp.* en los participantes (Tabla 7). A medida que aumentaron el

número de parejas sexuales en los participantes, existe 1.357 veces más de probabilidad de ser diagnosticado con *Ureaplasma spp.*, en comparación de aquellos que no las tengan. Así mismo, el consumo de alcohol aumenta 0.263 veces más la probabilidad de ser diagnosticado como positivo al género. Y como última variable, la probabilidad de resultar positivo en el diagnóstico de esta bacteria aumenta 5.692 veces en el caso de las mujeres. Ninguna de las demás variables tuvo efecto sobre la incidencia de esta bacteria ( $p > 0.05$ ) (para ver a detalle los coeficientes de las variables evaluadas sobre la ocurrencia de *Ureaplasma spp.* ver el Anexo 9).

**Tabla 7.** Coeficientes de las variables que tuvieron efecto sobre la probabilidad de ocurrencia de *Ureaplasma spp.*

		B	Error estándar	Sig. (p*)	Exp(B)
<b>Paso 4</b>	<b>Edad a la que inicio su vida sexual</b>	.278	.159	.080	1.320
	<b>Número de parejas sexuales que ha tenido</b>	.306	.139	.028**	1.357
	<b>Consumo de alcohol</b>	-1.335	.631	.034**	.263
	<b>Género</b>	1.739	.615	.005**	5.692
	<b>Constante</b>	-6.654	2.978	.025	.001

B= Coeficiente del modelo de regresión logística binaria; Exp(B)= Odd Ratio (OR) o razón de probabilidades; \* Valor de p; \*\* Valor significativo de p ( $p < 0.05$ ).

## 9. DISCUSIÓN

Algunas especies de micoplasmas son aisladas comúnmente del tracto urogenital en jóvenes sexualmente activos y su incidencia puede deberse a diferentes factores relacionados a su vida sexual. El estudio de los micoplasmas se ha centrado en pacientes que padecen algún tipo de problema médico, ya que es evidente la enfermedad, sin embargo, no hay que olvidar que estos también pertenecen a la microbiota normal del humano. Debido a esto, en algunas regiones del mundo ha

habido pocos informes sobre las tasas de detección de *Mycoplasma* y *Ureaplasma* urinarios en pacientes sanos asintomáticos (Jensen *et al.*, 2004).

En el presente trabajo se estimó la incidencia de *Mycoplasma spp.* y *Ureaplasma spp.* en una población universitaria sana, de igual manera, se estudiaron los posibles factores relacionados a su vida sexual que pudieran predisponer a un diagnóstico positivo de estas bacterias.

En México, pocos son los estudios que han publicado datos sobre la prevalencia de micoplasmas en pacientes sanos. Un estudio realizado por González-Pedraza y colaboradores (2007) en la Ciudad de México sobre el diagnóstico de infecciones cervicovaginales, mostró una incidencia del 18.1% (80/440) de *Ureaplasma spp.* y del 0.9% (4/440) de *M. hominis* en las mujeres participantes, en dicha investigación también se incluyó la búsqueda de otras bacterias y las participantes padecían algún tipo de infección en las vías urinarias y otro tipo de padecimientos, como diabetes mellitus tipo 2.

A diferencia de los datos previamente mencionados, en la presente investigación sólo se consideraron a pacientes sanos. Tomando en cuenta únicamente a los participantes que proporcionaron su género, el 31.18% (29/93) de ellos fueron diagnosticados con *Mycoplasma spp.* De las muestras proporcionadas por hombres, el 26.53% (13/49) fueron positivas en el diagnóstico y el 36.36% (16/44) de las mujeres participantes también fueron positivas a *Mycoplasma spp.* El diagnóstico de *Mycoplasma spp.* no mostró una tendencia en su incidencia entre hombres y mujeres. En el caso de *Ureaplasma spp.*, el 32.25% (30/93) de los participantes fueron positivos en el diagnóstico. De las muestras proporcionadas por hombres, el 18.36% (9/49) fueron positivas y el 47.72% (21/44) de las mujeres también lo fueron. En este caso, *Ureaplasma spp.* fue más frecuente en mujeres.

Un estudio realizado en la Ciudad de Puebla por Camacho y colaboradores (2009) reportó que el 64.6% (188/291) de las muestras, colectadas para su estudio, fueron positivas a micoplasmas y ureaplasmas; de esas 188 muestras, el 29.25% (55/188) fueron positivas a micoplasmas, el 28.19% (53/188) lo fueron para ureaplasmas y para ambos mollicutes lo fueron el 42.5% (80/188) de las muestras. Sin embargo,



las muestras utilizadas fueron de exudados vaginales, vulvares, uretrales y faríngeos, se desconoce con exactitud el diagnóstico de ambas bacterias entre géneros (hombre o mujer) y el estado de salud de los participantes, las muestras fueron colectadas mientras los pacientes se realizaban un examen microbiológico en un laboratorio clínico privado y sin que el médico solicitara un diagnóstico de mollicutes. Otro estudio realizado en el mismo estado y exclusivamente en mujeres, aisló *U. urealyticum* en el 31% (77/250) de las muestras (Rivera *et al.*, 2004), las muestras eran provenientes de pacientes VIH-1 negativas, se desconoce el resto de la historia clínica de las participantes. Considerando los datos ya mencionados, los resultados sobre la incidencia de ureaplasma reportados en esta investigación coinciden con los de otros trabajos realizados en el mismo estado. Sin embargo, debido a que la información existente sobre la incidencia de estas bacterias en el estado de Puebla aún es poca, es importante realizar un mayor número de estudios al respecto para una mejor comparación entre resultados.

Un estudio realizado por García-González en el estado de Yucatán, mostró la incidencia de *Mycoplasma spp.* en el 5.44% (8/147) de los participantes y de *Ureaplasma spp.* en el 43.53% (64/147) de ellos. En dicho estudio, se consideraron a pacientes con algún tipo de manifestación clínica genitourinaria y/o patología y a pacientes remitidos para un chequeo médico sin presentar signos o síntomas clínicos de algún tipo de infección urogenital. Del total de las muestras proporcionadas por hombres, el 1.9% (1/54) fueron positivas a *M. hominis*, el mismo porcentaje se reportó para *M. genitalium*. En mujeres, el porcentaje de incidencia de *M. hominis* fue del 5.4% (5/93) y del 1.1% (1/93) para *M. genitalium*. De las muestras proporcionadas por hombres, el 18.5% (10/54) fueron positivas a *U. parvum* y el 5.6% (3/54) a *U. urealyticum*. En mujeres, el porcentaje de incidencia de *U. parvum* fue del 41.9% (39/93) y del 12.9% (12/93) para *U. urealyticum*. El género *Ureaplasma spp.* fue el más diagnosticado en el estudio y fue más común en mujeres. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en esta investigación, las mujeres son las que muestran una mayor incidencia en el diagnóstico de ambos patógenos. Sin embargo, en este trabajo no hay una diferencia significativa en el diagnóstico del género *Mycoplasma* entre hombres y mujeres, por lo que

únicamente se podría considerar que, aunque sí fue mayor el diagnóstico de *Mycoplasma spp.* en mujeres, únicamente fue ese grupo el que mostró una predisposición a un diagnóstico positivo a *Ureaplasma spp.*

En Estados Unidos, *M. genitalium* fue detectado en el 16.6% (290/1743) de la población participante en el estudio realizado por Manhart y colaboradores (2023). Se desconoce la historia clínica de los participantes, las muestras urogenitales inicialmente fueron colectadas para ser analizadas para detectar gonorrea y/o clamidia. *M. genitalium* se detectó en el 17.6% (132/750) de las mujeres, siendo el grupo con más casos positivos. En el caso de los hombres, se presentó en el 15.9% (158/993) de ellos. De entre los participantes, de ambos sexos y de entre 18 y 24 años, el 23.8% (104/437) fue positivo a la especie, también lo fueron el 16.7% (77/460) de los participantes de entre 24 y 29 años; siendo los rangos de edad en los que la prevalencia de este microorganismo fue mayor, a excepción de los participantes menores de 18 años que representó el 30.4% (7/23). Estos resultados son diferentes a los obtenidos en este trabajo, sin embargo, muestra que la incidencia de estos microorganismos es mayor a edades de entre 18 y 29 años, edades entre las que se hizo esta investigación.

Datos obtenidos en Rusia por Rumyantseva y colaboradores (2019) reportan que *U. parvum* estuvo presente en 47.8% (1239/2594) de las pacientes, *U. urealyticum* en el 8.1% (209/2594) y *M. hominis* en el 14% (364/2594). En su investigación consideraron a mujeres con vaginosis bacteriana, con vaginitis aeróbica y a mujeres sin algún tipo de patología. En el grupo control, mujeres sanas, el 43.5% (771/1773) fueron positivas para *U. parvum*, el 5.9% (104/1773) fueron positivas para *U. urealyticum* y el 8.9% (158/1773) fueron positivas para *M. hominis*. En mujeres con vaginosis bacteriana, la incidencia de estas bacterias fue del 59.9% (452/754), 13.5% (102/754) y del 26.8% (202/754) respectivamente. Y en el caso de las pacientes con vaginitis aeróbica, la incidencia fue del 23.9% (16/67), 4.5% (3/67) y del 6% (4/67). Los datos nos muestran que en mujeres sanas la frecuencia de *Ureaplasma spp.* es mayor a comparación a la de *Mycoplasma spp.* A pesar de que el diagnóstico fue a nivel de género, los resultados obtenidos en esta investigación

para *Ureaplasma spp.* (47.72%) en mujeres coinciden con los obtenidos con Rumyantseva y colaboradores (2019).

Ahora bien, los trabajos mencionados anteriormente no consideraron factores que pudieran participar en la incidencia de estas bacterias.

Un estudio, realizado en hombres universitarios sanos, no encontró relación entre la tasa del diagnóstico de *M. hominis* y la frecuencia de los encuentros sexuales de los participantes. En pacientes sexualmente activos (75/100), las tasas de detección de *M. genitalium* fueron en el 1.3% (1/75), *M. hominis* en el 5.3% (4/75), *U. urealyticum* en el 16% (12/75) y *U. parvum* en el 29.3% (22/75) (Takahashi *et al.*, 2006). De nueva cuenta, el diagnóstico de micoplasma fue menor. Y ningún factor fue relacionado con la frecuencia del diagnóstico de micoplasmas, lo mismo reportado en esta investigación. Sin embargo, la tasa de detección de *U. urealyticum* se correlacionó significativamente con la frecuencia de los encuentros sexuales de los participantes, lo mismo ocurrió para *U. parvum*.

Informes sobre la prevalencia de *M. genitalium* en mujeres estudiantes, con y sin síntomas de infección genital, reportan un diagnóstico positivo en el 2.8% (7/249) de las participantes. En el estudio se consideraron factores que pudieran predisponer en la incidencia de esta bacteria. Todas las estudiantes con PCR positiva refirieron haber tenido más de cinco parejas sexuales en su vida. Además, tener una prueba positiva de *C. trachomatis* fue un factor de riesgo para la infección de *M. genitalium* (Hamasuna *et al.*, 2008). Lamentablemente, estos resultados no concuerdan con los obtenidos en esta investigación con respecto a *Mycoplasma spp.*, además de que los autores consideraron otros factores; como la coinfección por otro patógeno.

Otros estudios, realizados en mujeres que asistieron a atención ginecológica de rutina y sin signos de algún tipo de infección de transmisión sexual (ITS), han encontrado *M. hominis* en el 4.6% (142/3115) de las participantes; el aborto previo inducido y la edad de inicio de las relaciones sexuales se asociaron con la infección por este patógeno, sin embargo, ninguno de estos factores se asoció con los resultados obtenidos en el presente trabajo. *U. urealyticum* fue detectado en el 28%

(872/3115) de las participantes, se reportó que la infección disminuye con la edad  $\geq 35$  años y tiende a aumentar en mujeres con un mayor número de parejas sexuales y usuarias de dispositivo intrauterino (DIU) (Verteramo *et al.*, 2013). En la presente investigación, un mayor número de parejas sexuales predispone a la incidencia de *Ureaplasma spp.* Añadido a esto, otros estudios, en los que se han incluido a mujeres con y sin síntomas de infección genital, han encontrado que vivir en una zona rural, haber tenido cinco o más parejas sexuales en la vida y tener más de una pareja sexual en los últimos tres meses aumentan el riesgo de infección por *U. urealyticum*; mientras que mujeres sexualmente activas, con más de una pareja sexual en los últimos tres meses y presentar picazón y flujo vaginal se asociaron con un aumento en las probabilidades de infección por *U. parvum* (Lobão *et al.*, 2017). En el trabajo realizado por Lobão y colaboradores (2017) mostró una prevalencia de *U. urealyticum* en el 16.6% (50/302) de las participantes y *U. parvum* fue diagnosticado en el 60.6% (183/302) de ellas.

Otros estudios, realizados en mujeres no embarazadas y con posibilidad de padecer alguna ITS, determinaron que el uso de métodos anticonceptivos, el consumo de alcohol y el hecho de haber tenido más de una sexual en su vida (Holali *et al.*, 2021) son factores que influyeron en un diagnóstico positivo, lamentablemente estos factores fueron relacionados con el riesgo de contraer alguna de todas las ITS estudiadas en dicha investigación, no solo para micoplasmas y ureaplasmas. Esto solo demuestra la falta de información sobre el diagnóstico y factores que predisponen a la infección por *Mycoplasma spp.* y *Ureaplasma spp.* en pacientes sanos.

La orina se utiliza como una muestra clínica no invasiva y es empleada para el diagnóstico de patógenos a través de métodos microbiológicos y moleculares. Por lo que, este tipo de muestra es ideal en trabajos de investigación, el paciente puede tomar la muestra en privacidad, sin incomodidades, sin riesgos a equivocaciones en su toma y reduce el rechazo de la participación de los pacientes en comparación de otro tipo de muestras como exudados, que pueden ser incómodos e invasivos.

En esta investigación se diagnosticaron a las bacterias de interés por métodos microbiológicos y moleculares. El uso de cultivos microbiológicos para el diagnóstico de patógenos suele ser la técnica de primera elección en términos de costos, sin embargo, el diagnóstico de *Mollicutes* por métodos microbiológicos es lento y sensible a cambios de pH y presencia de otras bacterias. La PCR es una prueba de diagnóstico molecular que permite detectar un fragmento de ADN de un microorganismo en diferentes tipos de muestras clínicas como sangre, saliva, orina, moco, tejido, etc.; sin embargo, pueden existir inhibidores de estos ensayos, la principal consecuencia de una inhibición parcial o total de la PCR es una sensibilidad disminuida o resultados falsos negativos (Schrader *et al.*, 2012). Por estos factores, que pueden disminuir la sensibilidad del método de diagnóstico, el uso de dos métodos ha sido la estrategia más recomendada para minimizar resultados falsos (Timenetsky *et al.*, 2006). La PCR en combinación con cultivo es el procedimiento más recomendado (Uphoff & Drexler, 2002; Timenetsky *et al.*, 2006).

Investigaciones han mostrado una sensibilidad relativa del 61.4% para muestras de orina, 85.7% para hisopo vaginal, 74.3% para hisopo cervical y 24.3% para hisopo rectal (Lillis *et al.*, 2011) en la detección de *M. genitalium* por PCR en mujeres que asistieron a la clínica de ETS, donde se realizó la investigación, por cualquier motivo.

En otro estudio, donde participaron hombres y mujeres que asistieron a una clínica de ETS y de los que se desconoce el motivo su asistencia a la clínica, la primera micción de orina (FVU) mostró una sensibilidad relativa del 97.6% y la de los hisopados uretrales fue del 82.5%, esto para el diagnóstico de *M. genitalium* en hombres; concluyendo que, la FVU es la muestra de diagnóstico más sensible en el diagnóstico de este patógeno por PCR. En el mismo estudio, los hisopos uretrales detectaron el 57% de las infecciones, los hisopos cervicales detectaron el 71% y la FVU el 88% de los casos en mujeres; la muestra de FVU fue significativamente más eficiente que la muestra de hisopo uretral y cervical (Jensen *et al.*, 2004). A pesar de que la FVU fue más eficiente para la detección de este patógeno, los autores

recomiendan el uso de FVU y el de las muestras de hisopo uretral o cervical para aumentar la sensibilidad en el caso del diagnóstico en mujeres. Cabe añadir que, en un pequeño subconjunto de la FVU de mujeres, el almacenamiento de las muestras a -20°C dio lugar a resultados falsos negativos en el diagnóstico de *M. genitalium* por PCR, esto ocurrió en el 27% de las muestras que resultaron positivas cuando se realizó una preparación de la muestra antes de la congelación.

Considerando los puntos expuestos, debe considerarse el riesgo de obtener resultados falsos negativos en el diagnóstico de *Mycoplasma spp.* y *Ureaplasma spp.* por PCR, esto en comparación de los resultados obtenidos a través de métodos microbiológicos. Además, cabe señalar, que al igual que Jensen y colaboradores (2004), las muestras colectadas en la presente investigación también fueron conservadas a -20°C antes de ser procesadas por PCR.

La orina contiene inhibidores de PCR como urea, gonadotropina coriónica humana beta y cristales que pueden impedir la detección del ADN bacteriano (Khan *et al.*, 1991; Mahony *et al.*, 1998; Munch *et al.*, 2019). El componente más crítico en las muestras de orina es la urea, que puede provocar la degradación de la polimerasa (Saulnier & Andremont, 1992; Wilson, 1997; Schrader *et al.*, 2012). En este estudio únicamente se utilizaron muestras de pacientes que refirieron ser sanos (criterio de inclusión), pero se desconoce si las muestras proporcionadas contenían cristales, niveles de urea elevados o si alguna de las participantes se encontraba embarazada para el momento en el que se colectaron las muestras. La existencia de estos inhibidores pudo haber influido en que únicamente el 7% de las muestras fueran positivo en el diagnóstico para ambos géneros a través de PCR en comparación de los resultados obtenidos a través de métodos microbiológicos, el 37% por medio de cultivo líquido y el 25% por medio de cultivo sólido en el caso de *Mycoplasma spp.* y del 62% por medio de cultivo líquido y el 30% por medio de cultivo sólido para *Ureaplasma spp.*

Según Munch y colaboradores (2019) una alternativa para contar con una mayor concentración de ADN bacteriano en este tipo de muestras biológicas es utilizar un volumen de 30 mL de orina o más. No obstante, al realizar la centrifugación de la

orina para concentrar las bacterias, los cristales (como el oxalato de calcio, el ácido úrico y los cristales de fosfato amorfo o urato) pueden formar gránulos grandes, así que el uso de volúmenes de orina más grandes, pueden agravar aún más este problema.

Factores como el pH y las concentraciones de solutos en la orina, afectan en la formación de cristales. Los cristales de ácido úrico se forman en la orina ácida (pH < 5.8), y en la orina neutra o alcalina se tienden a formar cristales de fosfato de calcio y fosfato amorfo. Para disolver estos cristales, se puede calentar la orina, pero existe la posibilidad de la degradación del ADN, provocando falsos negativos en la prueba.

Por lo tanto, es preferible tanto el uso de métodos microbiológicos como el de métodos moleculares en el diagnóstico de cualquier patógeno, de esta manera se evitan falsos resultados debido a la contaminación de los medios de cultivo y a sus vires inespecíficos, los cambios en el pH y de inhibidores de PCR.

Además de los métodos ya mencionados, puede considerarse el uso de otros métodos en el diagnóstico de estos microorganismos y así, confirmar los resultados obtenidos. Tumino y colaboradores (2020) proponen la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) como un método molecular para el diagnóstico de agalactia contagiosa (CA), una enfermedad infecciosa responsable de la pérdida de ovejas productoras de leches y que es provocada por *Mycoplasma agalactiae*. En su trabajo, el ensayo LAMP pudo detectar *M. agalactiae* en 81 de 90 muestras de leche positivas, a diferencia de las 69 muestras positivas diagnosticadas por PCR en tiempo real. Siendo así, el método LAMP más sensible que la PCR en tiempo real, con una sensibilidad del 90% y del 77%, respectivamente. Así mismo, el tiempo que tardó la prueba y el costo del procedimiento fue menor por el ensayo LAMP que por PCR en tiempo real.

LAMP tiene la capacidad de amplificar un gen a alta eficiencia en condiciones isotérmicas de entre los 60 a 65 °C y, a diferencia de la PCR convencional y la PCR en tiempo real, es menos sensible a los inhibidores presentes en las muestras biológicas (Tumino *et al.*, 2020). LAMP no trabaja con ciclos a diferentes

temperaturas, con este método el ADN se incubaba a temperatura constante durante aproximadamente 60 minutos con cuatro cebadores diferentes para identificar seis regiones distintas en el gen objetivo y una polimerasa con alta actividad de desplazamiento de cadena (Itoh *et al.*, 2020).

Igualmente, Itoh y colaboradores (2020) proponen el método PURE–LAMP, en el que busca complementar el ensayo LAMP, para el diagnóstico *Mycoplasma bovis* en leche, con el procedimiento de extracción ultrarrápida (PURE). El LAMP determina la positividad basándose en un aumento de la turbidez; sin embargo, algunas muestras pueden ser muy turbias debido a sus componentes, como la leche que contiene grasa y caseína. El método PURE es una técnica de extracción y purificación de ADN en la que los componentes que inhiben la amplificación y detección del ADN se absorben en un material poroso y se filtran. A pesar de lo atractiva que puede sonar esta técnica, se debe probar su eficacia en muestras de orina humana ya que, únicamente se ha utilizado de manera veterinaria en muestras de sangre, hisopos de garganta y esputo.

Por todo lo anterior, el principal aporte de este trabajo fue identificar la incidencia de la colonización por *Mycoplasma spp.* y *Ureaplasma spp.*, patógenos clasificados como de transmisión sexual, en una población sana. Esto ayuda a ampliar el panorama de lo que se conoce hasta el momento, pues su estudio en este tipo de población es escaso en comparación a su estudio en relación con otras bacterias, su relación a otras patologías en el ser humano y su estudio en otras regiones geográficas. Específicamente, en este trabajo se halló que la incidencia de *Mycoplasma spp.* no fue significativamente diferente entre hombres y mujeres, por lo que podríamos concluir que no hay una tendencia en su prevalencia con respecto al género. En cuanto a *Ureaplasma spp.*, mostró ser más frecuente en mujeres que en hombres, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura.

De igual manera, esta investigación identificó los posibles factores, relacionados a la vida sexual de los participantes, que pudieran predisponer a un diagnóstico positivos a estas bacterias, como lo es el género (mujer), el número de parejas



sexuales y el consumo de alcohol en el caso de *Ureaplasma spp.* Para *Mycoplasma spp.* no se halló algún factor que influyera en su diagnóstico.

Añadido a lo anterior, también se menciona los posibles errores cometidos durante el diagnóstico de estos microorganismos, los pueden provocar falsos resultados, por lo que se debe tomar atención a los métodos y técnicas que se apliquen en su diagnóstico.

Se espera que este trabajo incite al estudio de este tipo de bacterias en poblaciones sanas y de los factores que inciden en su incidencia, y de esta manera poder encontrar formas para su prevención (pues son considerados organismos de transmisión sexual), identificar los riesgos de salud que pueden provocar en el paciente y ampliar y/o cubrir vacíos de lo que se sabe hasta ahora sobre estos microorganismos.

## 10. CONCLUSIONES

- La incidencia de *Mycoplasma spp.* en la población universitaria sana fue del 38.18%, incluyendo hombres y mujeres.
- No existe diferencia significativa entre el número de diagnósticos positivos para *Mycoplasma spp.* entre hombres (26.53%) y mujeres (36.36%). Por lo que no existe una predisposición en su incidencia con respecto al género.
- No existen factores, de los aquí estudiados (vida sexual activa, la edad a la que iniciaron su vida sexual, el número de veces que tienen relaciones sexuales al mes, el número de parejas sexuales que han tenido, el uso o no de algún preservativo de barrera, el consumo o no de alcohol y tabaco y el género de los participantes), que predisponga a un diagnóstico positivo para *Mycoplasma spp.*
- La incidencia de *Ureaplasma spp.* en la población universitaria sana fue del 32.25%, incluyendo hombres y mujeres.
- Las mujeres (47.72%) muestran una mayor predisposición a un diagnóstico positivo a *Ureaplasma spp.* a comparación de los hombres (18.36%).

- El número de parejas sexuales, el consumo de alcohol y el género son factores que pueden predisponer a un diagnóstico positivo a *Ureaplasma spp.*

## **11. PERSPECTIVAS**

- 1) Ampliar y unificar el número de participantes de cada género y edad en la investigación.
- 2) Examinar la posibilidad de incluir otros tipos de muestras, como exudados, en el trabajo de investigación.
- 3) Considerar posibles factores que puedan generar un resultado falso negativo en los métodos microbiológicos e incluir un método para reducirlos.
- 4) Incluir un método para disminuir los factores que puedan inhibir y generar un falso negativo en su diagnóstico por PCR.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Blanchard, A., Hentschel, J., Duffy, L., Baldus, K., & Cassell, G. H. (1993). Detection of *Ureaplasma urealyticum* by Polymerase Chain Reaction in the Urogenital Tract of Adults, in Amniotic Fluid, and in the Respiratory Tract of Newborns. *Clinical Infectious Diseases*, 17(Suppl 1), S148–S153. [https://doi.org/10.1093/clinids/17.supplement\\_1.s148](https://doi.org/10.1093/clinids/17.supplement_1.s148)

Bové, J. M. (1993). Molecular Features of Mollicutes. *Clinical Infectious Diseases*, 17(Supplement\_1), S10-S31. [https://doi.org/10.1093/clinids/17.supplement\\_1.s10](https://doi.org/10.1093/clinids/17.supplement_1.s10)

Camacho, D. M. M., Villa, E. B., Arenas, R. R., Ramírez, L. C., & Tapia, J. A. R. (2009). Aislamiento de mollicutes en faringe y tracto urogenital. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 29(1), 6-10.

Cazanave, C., Manhart, L. E., & Bébéar, C. (2012). *Mycoplasma genitalium*, an emerging sexually transmitted pathogen. *Medecine Et Maladies Infectieuses*, 42(9), 381-392. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2012.05.006>

Cedillo, L., & Yañez, J. (2003). Los micoplasmas y el SIDA. *Elementos: Ciencia y Cultura*, marzo-mayo, 10(49), 23-27.

Chowdhury, I. H., Munakata, T., Koyanagi, Y., Kobayashi, S., Arai, S., & Yamamoto, N. (1990). Mycoplasma can enhance HIV replication in vitro: a possible cofactor responsible for the progression of AIDS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 170(3), 1365–1370. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(90\)90545-x](https://doi.org/10.1016/0006-291x(90)90545-x)

De Jong, Z., Pontonnier, F., Plante, P., Perie, N., Talazac, N., Mansat, A., & Chabanon, G. (1990). Comparison of the incidence of *Ureaplasma urealyticum* in infertile men and in donors of semen. *European Urology*, 18(2), 127–131. <https://doi.org/10.1159/000463889>

Fraser, C. M., Gocayne, J. D., White, O., Adams, M. D., Clayton, R. A., Fleischmann, R., Bult, C. J., Kerlavage, A. R., Sutton, G., Kelley, J. M., Fritchman, J. L., Weidman,

J., Small, K. V., Sandusky, M., Fuhrmann, J., Nguyen, D. N., Utterback, T., Saudek, D. M., Phillips, C., . . . Venter, J. C. (1995). The Minimal Gene Complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*, 270(5235), 397-404. <https://doi.org/10.1126/science.270.5235.397>

García-González, I., López-Díaz, R. I., Canché-Pech, J. R., Ceballos-López, A. A., & López-Novelo, M. E. (2017). Prevalencia de infecciones de transmisión sexual en pacientes sintomáticos y asintomáticos de Yucatán. *Revista del Laboratorio Clínico*, 10(3), 117-122. <https://doi.org/10.1016/j.labcli.2017.02.003>

Gdoura, R., Kchaou, W., Chaari, C., Znazen, A., Keskes, L., Rebai, T., & Hammami, A. (2007). *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma Genitalium* infections and semen quality of infertile men. *BMC Infectious Diseases*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-7-129>

González-Pedraza Avilés, A., Ortiz Zaragoza, C., Dávila Mendoza, R., & Valencia Gómez, C. M. (2007). Infecciones cervicovaginales más frecuentes: prevalencia y factores de riesgo. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 33(2), 0-0.

Halbedel, S., & Stülke, J. (2007). Tools for the genetic analysis of *Mycoplasma*. *International Journal of Medical Microbiology*, 297(1), 37-44. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.11.001>

Hamasuna, R., Imai, H., Tsukino, H., Jensen, J. S., & Osada, Y. (2008). Prevalence of *Mycoplasma genitalium* among female students in vocational schools in Japan. *Sexually Transmitted Infections*, 84(4), 303–305. <https://doi.org/10.1136/sti.2007.028670>

Hill, A. C. (1991). *Mycoplasma spermatophilum*, a New Species Isolated from Human Spermatozoa and Cervix. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(2), 229-233. <https://doi.org/10.1099/00207713-41-2-229>

Hill, A. C., Tucker, M., Whittingham, D. G., & Craft, I. (1987). Mycoplasmas and in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 47(4), 652-655. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)59117-1](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)59117-1)

Holali, A. H., Katawa, G., Ritter, M., Tchopba, C. N., Tchadié, P. E., Arndts, K., Kamassa, H. E., Mazou, B., Amessoudji, M. O., N'djao, A., Agoro, S., Vogelbusch, C., Omondi, M. A., Kolou, M., Karou, S. D., Horsnell, W. G. C., Hoerauf, A., Améyapoh, Y., & Layland, L. E. (2021). Hookworm Infections and Sociodemographic Factors Associated with Female Reproductive Tract Infections in Rural Areas of the Central Region of Togo. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.738894>

Itoh, M., Hirano, Y., Yamakawa, K., Yasutomi, I., Kuramoto, K., Furuoka, M., & Yamada, K. (2020). Combination of procedure for ultra rapid extraction (PURE) and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of *Mycoplasma bovis* in milk. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 82(7), 875–880. <https://doi.org/10.1292/jvms.19-0695>

Jensen, J. S., Björnelius, E., Dohn, B., & Lidbrink, P. (2004). Comparison of First Void Urine and Urogenital Swab Specimens for Detection of *Mycoplasma genitalium* and *Chlamydia trachomatis* by Polymerase Chain Reaction in Patients Attending a Sexually Transmitted Disease Clinic. *Sexually Transmitted Diseases*, 31(8), 499–507. <https://doi.org/10.1097/01.olq.0000135992.98883.e4>

Khan, G., Kangro, H. O., Coates, P. J., & Heath, R. B. (1991). Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA. *Journal of Clinical Pathology*, 44(5), 360–365. <https://doi.org/10.1136/jcp.44.5.360>

Klein, J. O., Buckland, D., & Finland, M. (1969). Colonization of newborn infants by mycoplasmas. *The New England Journal of Medicine*, 280(19), 1025-1030. <https://doi.org/10.1056/nejm196905082801901>

Kokkayil, P., & Dhawan, B. (2015). Ureaplasma: Current perspectives. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 33(2), 205-214. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.154850>

Kong, F., Ma, Z., James, G., Gordon, S., & Gilbert, G. L. (2000). Molecular genotyping of human Ureaplasma species based on multiple-banded antigen (MBA)

gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50 Pt 5, 1921–1929. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-5-1921>

Lillis, R. A., Nsuami, M. J., Myers, L., & Martin, D. H. (2011). Utility of Urine, Vaginal, Cervical, and Rectal Specimens for Detection of *Mycoplasma genitalium* in women. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(5), 1990–1992. <https://doi.org/10.1128/JCM.00129-11>

Lo, S., Hayes, M. M., Tully, J. G., Wang, R. Y., Kotani, H., Pierce, P. F., Rose, D. L., & Shih, J. W. (1992). *Mycoplasma penetrans* sp. nov., from the Urogenital Tract of Patients with AIDS. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(3), 357-364. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-3-357>

Lo, S., Hayes, M. M., Wang, R., Pierce, P. F., Kotani, H., & Shih, J. (1991). Newly discovered mycoplasma isolated from patients infected with HIV. *The Lancet*, 338(8780), 1415-1418. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)92721-d](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)92721-d)

Lobão, T. N., Campos, G. B., Selis, N., Amorim, A. T., Souza, S. G., Mafra, S. S., Pereira, L., Santos, D. B. D., Figueiredo, T. B., Marques, L. M., & Timenetsky, J. (2017). *Ureaplasma urealyticum* and *U. parvum* in Sexually active women attending public health clinics in Brazil. *Epidemiology and Infection*, 145(11), 2341-2351. <https://doi.org/10.1017/s0950268817001145>

López-Ávila, K., Zavala-Castro, J., Arias-León, J., Puerto, F. I., & Dzul-Rosado, K. (2014). Infertilidad humana causada por Mycoplasma Spp. *Revista Biomédica*, 25(2), 74-90. <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v25i2.49>

Mahony, J., Chong, S., Jang, D., Luinstra, K., Faught, M., Dalby, D., Sellors, J., & Chernesky, M. (1998). Urine Specimens from Pregnant and Nonpregnant Women Inhibitory to Amplification of *Chlamydia trachomatis* Nucleic Acid by PCR, Ligase Chain Reaction, and Transcription-Mediated Amplification: Identification of Urinary Substances Associated with Inhibition and Removal of Inhibitory Activity. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(11), 3122–3126. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.11.3122-3126.1998>

Manhart, L. E., & Kay, N. A. (2010). *Mycoplasma genitalium*: Is it a Sexually Transmitted Pathogen?. *Current Infectious Disease Reports*, 12(4), 306-313. <https://doi.org/10.1007/s11908-010-0114-3>

Manhart, L. E., Holmes, K. K., Hughes, J. P., Houston, L. L., & Totten, P. A. (2007). *Mycoplasma genitalium* Among Young Adults in the United States: An Emerging Sexually Transmitted Infection. *American Journal of Public Health*, 97(6), 1118-1125. <https://doi.org/10.2105/ajph.2005.074062>

Manhart, L. E., Leipertz, G., Soge, O. O., Jordan, S. J., McNeil, C. J., Pathela, P., Reno, H., Wendel, K. A., Parker, A., Geisler, W. M., Getman, D., & Golden, M. R. (2023). *Mycoplasma genitalium* in the US (MyGENiUS): Surveillance data from sexual health clinics in 4 US regions. *Clinical Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/cid/ciad405>

Maniloff, J. (2002). Phylogeny and Evolution. En: Razin, S. & Herrmann, R. (Eds), *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas* (31-43). *Springer*, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/0-306-47606-1\\_2](https://doi.org/10.1007/0-306-47606-1_2)

McCormack, W. M., Almeida, P. C., Bailey, P. E., Grady, E. M., & Lee, Y. H. (1972). Sexual Activity and Vaginal Colonization with Genital Mycoplasmas. *The Journal of the American Medical Association*, 221(12), 1375–1377. <https://doi.org/10.1001/jama.1972.03200250017004>

McCormack, W. M., Lee, Y. H., & Zinner, S. H. (1973). Sexual Experience and Urethral Colonization with Genital Mycoplasmas: A Study in Normal Men. *Annals of Internal Medicine*, 78(5), 696–698. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-78-5-696>

Miranda, C., Camacho, E., Reina, G., Turiño, J., Rodríguez-Granger, J., Yeste, R., Bautista, M. F., García, M. S., Alados, J. C., & De La Rosa, M. (2005). Isolation of *Mycoplasma hominis* from extragenital cultures. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 24(5), 334-337. <https://doi.org/10.1007/s10096-005-1326-6>

- Munch, M. M., Chambers, L. C., Manhart, L. E., Domogala, D., Lopez, A., Fredricks, D. N., & Srinivasan, S. (2019). Optimizing bacterial DNA extraction in urine. *PLoS One*, 14(9), e0222962. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222962>
- Naessens, A., Foulon, W., Debrucker, P., Devroey, P., & Lauwers, S. (1986). Recovery of microorganisms in semen and relationship to semen evaluation. *Fertility and Sterility*, 45(1), 101-105. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)49105-3](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)49105-3)
- Nocard, E., Roux, E. R., & Borrel, A. (1898). Le microbe de la peripneumonie. *Ann. Inst. Pasteur*, 12, 240-262.
- Ortiz, F. J. (2009). Importancia diagnóstica de los micoplasmas y su participación en la salud reproductiva y perinatal. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 29(2), 53.
- Paralanov, V., Lu, J., Duffy, L. B., Crabb, D. M., Shrivastava, S., Methé, B. A., Inman, J., Yooseph, S., Xiao, L., Cassell, G. H., Waites, K. B., & Glass, J. I. (2012). Comparative genome analysis of 19 *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* strains. *BMC Microbiology*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-88>
- Pariasca, J. C. (2003). Fisiopatología de las infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*. *Paediatrica*, 5(2), 101-108.
- Pérez, I. (2009). Evaluación de Medios de Cultivo para *Mycoplasma pneumoniae*. *Vitae: Academia Biomédica Digital*, (38), 2.
- Pérez, I., Gómez, M., & González Rico, S. (2007). El diagnóstico convencional de *Mycoplasma pneumoniae* como agente causal de Neumonías Adquiridas en la Comunidad (NAC). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 27(2), 73-78.
- Pollack, J.D. (2002). Central Carbohydrate Pathways: Metabolic Flexibility and the Extra Role of Some "Housekeeping" Enzymes. En: Razin, S. & Herrmann, R. (Eds), *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas* (163-199). *Springer*, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/0-306-47606-1\\_8](https://doi.org/10.1007/0-306-47606-1_8)



- Posse, T., Prieto, M., Cipolla, L., & Kaufman, S. (2017). *Mycoplasma hominis* bacteremia. An underestimated etiological agent. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(1), 45–47. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.02.009>
- Rashidbaigi, A., Testa, D., & Liao, M. J. (1995). Competitor internal standards for quantitative detection of mycoplasma DNA. *FEMS Microbiology Letters*, 128(2), 207-211. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07524.x>
- Rawadi, G., Dujeancourt-Henry, A., Lemercier, B., & Roulland-Dussoix, D. (1998). Phylogenetic position of rare human mycoplasmas, *Mycoplasma faucium*, *M. buccale*, *M. primatum* and *M. spermatophilum*, based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(1), 305–309. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-1-305>
- Razin, S. (1978). The Mycoplasmas. *Microbiological Reviews*, 42(2), 414-470. <https://doi.org/10.1128/mr.42.2.414-470.1978>
- Razin, S., & Hayflick, L. (2010). Highlights of Mycoplasma Research—An historical perspective. *Biologicals*, 38(2), 183-190. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.11.008>
- Razin, S., Masover, G. K., Palant, M., & Hayflick, L. (1977). Morphology of Ureaplasma urealyticum (T-mycoplasma) organisms and colonies. *Journal of Bacteriology*, 130(1), 464–471. <https://doi.org/10.1128/jb.130.1.464-471.1977>
- Rivera, J. A. R., Torres, M. C., Olea, M. D. R. S., & Preval, N. R. (2004). Prevalencia de *Ureaplasma urealyticum* en mujeres. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 51(1), 33-36.
- Rodríguez, B. V., Otero, A. J., Alfonso, J. L. & Rodríguez, A. (1987). Micoplasmas y cultivos celulares. *Interferón y Biotecnología*, 4(2), 95-107.
- Ruiter, M., & Wentholt, H. M. (1953). Isolation of a pleuropneumonia-like organism (G-strain) in a case of fusospiillary vulvovaginitis. *Acta Dermatovenereologica*, 33(1-2), 123-129.
- Ruiter, M., & Wentholt, H. M. M. (1950). A Pleuropneumonia-Like organism in primary fusospirochetal gangrene of the penis. *Journal of Investigative Dermatology*. <https://doi.org/10.1038/jid.1950.104>

Rumyantseva, T., Khayrullina, G., Guschin, A., & Donders, G. (2019). Prevalence of *Ureaplasma spp.* and *Mycoplasma hominis* in healthy women and patients with flora alterations. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 93(3), 227-231. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.10.001>

Sasaki, Y., Ishikawa, J., Yamashita, A., Oshima, K., Kenri, T., Furuya, K., Yoshino, C., Horino, A., Shiba, T., Sasaki, T., & Hattori, M. (2002). The complete genomic sequence of *Mycoplasma penetrans*, an intracellular bacterial pathogen in humans. *Nucleic Acids Research*, 30(23), 5293–5300. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf667>

Saulnier, P., & Andremont, A. (1992). Detection of genes in feces by booster polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(8), 2080–2083. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.8.2080-2083.1992>

Schelonka, R. L., & Waites, K. B. (2007). Ureaplasma Infection and Neonatal Lung Disease. *Seminars in Perinatology*, 31(1), 2-9. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2007.01.001>

Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014–1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>

Sethi, S., Singh, G., Samanta, P., & Sharma, M. (2012). *Mycoplasma genitalium*: An emerging sexually transmitted pathogen. *The Indian Journal of Medical Research*, 136(6), 942–955.

Takahashi, S., Takeyama, K., Miyamoto, S., Ichihara, K., Maeda, T., Kunishima, Y., Matsukawa, M., & Tsukamoto, T. (2006). Detection of *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, and *Ureaplasma parvum* DNAs in urine from asymptomatic healthy young Japanese men. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 12(5), 269-271. <https://doi.org/10.1007/s10156-006-0462-y>

Taylor-Robinson, D. (1989). Genital Mycoplasma Infections. *Clinics in Laboratory Medicine*, 9(3), 501–523. [https://doi.org/10.1016/S0272-2712\(18\)30615-2](https://doi.org/10.1016/S0272-2712(18)30615-2)

Taylor-Robinson, D. (1995). The Harrison Lecture. The History and Role of *Mycoplasma genitalium* in Sexually Transmitted Diseases. *Sexually Transmitted Infections*. <https://doi.org/10.1136/sti.71.1.1>

Taylor-Robinson, D. (2017). *Mollicutes* in vaginal microbiology: *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* and *Mycoplasma genitalium*. *Research in Microbiology*, 168(9-10), 875-881. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.02.009>

Taylor-Robinson, D., & Furr, P. M. (1998). Update on sexually transmitted mycoplasmas. *The Lancet*, 351, S12-S15. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(98\)90004-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(98)90004-6)

Thomsen, A. C. (1974). The isolation of *Mycoplasma primatum* during an autopsy study of the mycoplasma flora of the human urinary tract. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica. Section B: Microbiology and Immunology*, 82B(5), 653–656. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1974.tb00232.x>

Timenetsky, J., Santos, L. M., Buzinhani, M., & Mettifogo, E. (2006). Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39(7), 907–914. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2006000700009>

Tully, J. G. (1993). Current Status of the Mollicute Flora of Humans. *Clinical Infectious Diseases*, 17(Supplement\_1), S2-S9. [https://doi.org/10.1093/clinids/17.supplement\\_1.s2](https://doi.org/10.1093/clinids/17.supplement_1.s2)

Tully, J. G., Taylor-Robinson, D., Cole, R. M., & Rose, D. L. (1981). A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract. *The Lancet*, 1(8233), 1288–1291. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(81\)92461-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(81)92461-2)

Tumino, S., Tolone, M., Parco, A., Puleio, R., Arcoleo, G., Manno, C., Nicholas, R. A. J., & Loria, G. R. (2020). Validation of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Field Tool for Rapid and Sensitive Diagnosis of Contagious Agalactia in Small Ruminants. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 10(3), 509. <https://doi.org/10.3390/ani10030509>

Upadhyaya, M., Hibbard, B. M., & Walker, S. M. (1984). The effect of *Ureaplasma urealyticum* on semen characteristics. *Fertility and Sterility*, 41(2), 304-308. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)47609-0](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)47609-0)

Uphoff, C. C., & Drexler, H. G. (2002). Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 38(2), 79–85. [https://doi.org/10.1290/1071-2690\(2002\)038<0079:CPAFDO>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1290/1071-2690(2002)038<0079:CPAFDO>2.0.CO;2)

Verteramo, R., Patella, A., Calzolari, E., Recine, N., Marcone, V., Osborn, J., Chiarini, F., & Degener, A. M. (2013). An epidemiological survey of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in gynaecological outpatients, Rome, Italy. *Epidemiology and Infection*, 141(12), 2650-2657. <https://doi.org/10.1017/s0950268813000277>

Waites, K. B. (2006). Mycoplasma and ureaplasma. En: *Congenital and Perinatal Infections: A Concise Guide to Diagnosis* (pp. 271-288). Humana Press, Totowa, NJ.

Waites, K. B., & Talkington, D. F. (2004). *Mycoplasma pneumoniae* and Its Role as a Human Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 697–728. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.697-728.2004>

Waites, K. B., Katz, B., & Schelonka, R. L. (2005). Mycoplasmas and Ureaplasmas as Neonatal Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 757-789. <https://doi.org/10.1128/cmr.18.4.757-789.2005>

Wang, Y., Liang, C., Wu, J., Xu, C., Qin, S., & Gao, E. (2006). Do *Ureaplasma urealyticum* infections in the genital tract affect semen quality?. *Asian Journal of Andrology*, 8(5), 562-568. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2006.00190.x>

Wilson I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10), 3741–3751. <https://doi.org/10.1128/aem.63.10.3741-3751.1997>

Xiao, L., Glass, J. I., Paralanov, V., Yooseph, S., Cassell, G. H., Duffy, L. B., & Waites, K. B. (2010). Detection and characterization of human *Ureaplasma* species and serovars by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, *48*(8), 2715–2723. <https://doi.org/10.1128/JCM.01877-09>

Xu, C., Sun, G. F., Zhu, Y. F., & Wang, Y. F. (1997). The correlation of *Ureaplasma urealyticum* infection with infertility. *Andrologia*, *29*(4), 219-226. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1997.tb00319.x>

Yamao, F., Muto, A., Kawauchi, Y., Iwami, M., Iwagami, S., Azumi, Y., & Osawa, S. (1985). UGA is read as tryptophan in *Mycoplasma capricolum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *82*(8), 2306-2309. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.8.2306>

# ANEXOS

**ANEXO 1:**

**Encuesta aplicada a los participantes voluntarios en el estudio**

**BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA  
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS -  
INSTITUTO DE CIENCIAS (ICUAP)**

**No de Serie:** \_\_\_\_\_

**Edad:** \_\_\_\_\_ **Sexo:** M / F / Prefiero no contestar

1. ¿Tiene una vida sexual activa? Si / No, ¿a qué edad inició su vida sexual?

\_\_\_\_\_

2. ¿Con qué frecuencia al mes tiene relaciones sexuales? \_\_\_\_\_

3. ¿Cuántas parejas sexuales ha tenido hasta el momento? \_\_\_\_\_

4. ¿Utiliza preservativos u otro método para prevenir las enfermedades de transmisión sexual (ETS)? Si / No

5. ¿Fuma o consume bebidas alcohólicas? Si, ¿cuál? \_\_\_\_\_ /  
No

## **ANEXO 2:**

### **Consentimiento informado sobre la privacidad y uso de los datos de los participantes**

Facultad de Biología

BUAP

Consentimiento Informado

Yo \_\_\_\_\_ declaro que he sido informado e invitado a participar en una investigación denominada “Detección de *Micoplasmas spp.*, en una población universitaria”, esté es un proyecto de investigación científica que cuenta con el respaldo y financiamiento de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Entiendo que este estudio busca conocer la frecuencia con que se aíslan por métodos microbiológicos y detección molecular especies de micoplasmas en una población universitaria a partir de muestras de orina matutina en ayunas. Además de contestar una encuesta que demorará alrededor de 15 minutos. Me han explicado que la información registrada será confidencial, y que los nombres de los participantes serán asociados a un número de serie, esto significa que las respuestas no podrán ser conocidas por otras personas ni tampoco ser identificadas en la fase de publicación de resultados.

Estoy en conocimiento que los datos no me serán entregados y que no habrá retribución por la participación en este estudio, sí que esta información podrá beneficiar de manera indirecta y por lo tanto tiene un beneficio para la sociedad dada la investigación que se está llevando a cabo.

Asimismo, sé que puedo negar la participación o retirarme en cualquier etapa de la investigación, sin expresión de causa ni consecuencias negativas para mí.

Sí. Acepto voluntariamente participar en este estudio.

Fecha:



Si tiene alguna pregunta durante cualquier etapa del estudio puede comunicarse con el Dr. José Antonio Sánchez Hernández del Comité de Ética Institucional, Facultad de Medicina de la BUAP., al teléfono 2224904652.

Documento basado en acuerdo a la Declaración de Helsinki.

### **ANEXO 3:**

#### **Preparación de 100 mL de caldo Eaton**

1. Pesar en una balanza 2 gr de medio base para micoplasmas y 0.5 gr de dextrosa.
2. En un matraz, mezclar los reactivos con 65 mL de agua destilada y añadir 1 mL de rojo de fenol.
3. Esterilizar en la autoclave a una presión 15 lb durante 15 minutos. Terminado el tiempo, retirar de la autoclave y dejar enfriar.
4. Una vez frío, agregar al matraz 10 mL de dializado de levadura, 0.12 gr de penicilina y 25 mL de suero de caballo.
5. Incubar a 37°C durante un día como prueba de esterilidad.

### **ANEXO 4:**

#### **Preparación de 100 mL de agar Eaton**

1. Pesar en una balanza 2 gr de medio base para micoplasmas, 0.5 gr de dextrosa y 1.3 gr de agar bacteriológico.
2. En un matraz, mezclar los reactivos con 65 mL de agua. Homogeneizar la mezcla colocando matraz bajo un mechero y agitar, teniendo cuidado de no derramar la mezcla.
3. Esterilizar en la autoclave cada medio a una presión 15 lb durante 15 minutos. Terminado el tiempo, retirar de la autoclave y dejar enfriar a temperatura ambiente, sin dejar gelificar.

4. Una vez frío, agregar al matraz 10 mL de dializado de levadura, 0.12 gr de penicilina y 25 mL de suero de caballo.
5. Verter en placas Petri estériles y dejar gelificar. Incubar a 37°C durante un día como prueba de esterilidad.

## **ANEXO 5:**

### **Preparación de 100 mL de caldo Urea**

1. Pesar en una balanza 2 gr de medio base para micoplasmas, mezclar en un matraz con 65 mL de agua destilada y añadir 1 mL de rojo de fenol.
2. Esterilizar en la autoclave a una presión 15 lb durante 15 minutos. Terminado el tiempo, retirar de la autoclave y dejar enfriar.
3. Una vez frío, agregar al matraz 10 mL de dializado de levadura, 0.12 gr de penicilina, 25 mL de suero de caballo y 5 mL de urea al 10%.
4. Incubar a 37°C durante un día como prueba de esterilidad.

## **ANEXO 6:**

### **Preparación de 100 mL de agar Urea**

1. Pesar en una balanza 2 gr de medio base para micoplasmas y 1.3 gr de agar bacteriológico.
5. En un matraz, mezclar los reactivos con 65 mL de agua. Homogeneizar la mezcla colocando matraz bajo un mechero y agitar, teniendo cuidado de no derramar la mezcla.
6. Esterilizar en la autoclave cada medio a una presión 15 lb durante 15 minutos. Terminado el tiempo, retirar de la autoclave y dejar enfriar a temperatura ambiente, sin dejar gelificar.
7. Una vez frío, agregar al matraz 10 mL de dializado de levadura, 0.12 gr de penicilina, 25 mL de suero de caballo y 5 mL de urea al 10%.
8. Verter en placas Petri estériles y dejar gelificar. Incubar a 37°C durante un día como prueba de esterilidad.

## **ANEXO 7:**

### **Extracción de ADN genómico de las muestras**

Una vez descongelado el cultivo en fase líquida:

1. En un tubo Eppendorf estéril colocar 400µL de cultivo de micoplasmas o ureaplasmas en fase líquida. Centrifugar a 10 000 rpm durante dos minutos.
2. Decantar el sobrenadante en un frasco. Al botón adicionar 400µL de Genomic Lysis Buffer. Mezclar y llevar al vortex a velocidad máxima durante un minuto y colocar en un cuarto de temperatura a durante un tiempo de 5 a 10 minutos.
3. Transferir la mezcla anterior a un tubo Zymo-Spin IICR Column con su respectivo Collection Tube. Centrifugar a 10 000 rpm durante un minuto. Desechar el Collection Tube.
4. Transferir el Zymo-Spin IICR Column a un nuevo Collecticu Tube. Adicionar 200µL de DNA Pre-Wash Buffer al Zymo-Spin IICR Column. Centrifugar a 10 000 rpm durante un minuto.
5. Adicionar 500µL de g-DNA Wash Buffer al Zymo-Spin IICR Column. Centrifugar a 10 000 rpm durante un minuto.
6. Transferir el Zymo-Spin IICR Column a un tubo Eppendorf estéril. Adicionar 50µL de DNA Elution Buffer al Zymo-Spin IICR Column. Incubar durante un tiempo de dos a cinco minutos en un cuarto de temperatura.
7. Centrifugar a 10 000 rpm durante 30 segundos para eluir el DNA.

El producto se puede utilizar inmediatamente para su procesamiento o guardarse a -20°C para su futuro uso.

**ANEXO 8:**

**Coeficientes de las variables evaluadas sobre la ocurrencia de *Mycoplasma spp.***

		<b>B</b>	<b>Error estándar</b>	<b>Sig. (p*)</b>	<b>Exp(B)</b>
<b>Paso 1</b>	<b>Tiene una vida sexual activa</b>	-.333	.617	.589	.717
	<b>Edad a la que inicio su vida sexual</b>	.112	.143	.433	1.118
	<b>Número de parejas sexuales que ha tenido</b>	.147	.121	.228	1.158
	<b>Uso de preservativo</b>	-1.357	1.257	.280	.257
	<b>Consumo de alcohol</b>	.484	.557	.385	1.623
	<b>Consumo de tabaco</b>	.136	.746	.855	1.146
	<b>Género</b>	.783	.552	.156	2.187
	<b>Constante</b>	-3.375	2.668	.206	.034
<b>Paso 2</b>	<b>Tiene una vida sexual activa</b>	-.352	.608	.563	.703
	<b>Edad a la que inicio su vida sexual</b>	.112	.143	.435	1.118
	<b>Número de parejas sexuales que ha tenido</b>	.151	.119	.203	1.163
	<b>Uso de preservativo</b>	-1.366	1.262	.279	.255
	<b>Consumo de alcohol</b>	.475	.554	.392	1.608
	<b>Género</b>	.755	.531	.155	2.128
	<b>Constante</b>	-3.334	2.659	.210	.036
	<b>Paso 3</b>	<b>Edad a la que inicio su vida sexual</b>	.111	.143	.440
<b>Número de parejas sexuales que ha tenido</b>		.135	.115	.241	1.145

	<b>Uso de preservativo</b>	-1.412	1.241	.255	.244
	<b>Consumo de alcohol</b>	.495	.552	.371	1.640
	<b>Género</b>	.738	.529	.163	2.092
	<b>Constante</b>	-3.524	2.646	.183	.029
<b>Paso 4</b>	<b>Número de parejas sexuales que ha tenido</b>	.098	.104	.349	1.103
	<b>Uso de preservativo</b>	-1.489	1.199	.214	.226
	<b>Consumo de alcohol</b>	.529	.549	.336	1.697
	<b>Género</b>	.767	.523	.143	2.153
	<b>Constante</b>	-1.537	.577	.008	.215
<b>Paso 5</b>	<b>Uso de preservativo</b>	-1.325	1.141	.245	.266
	<b>Consumo de alcohol</b>	.570	.544	.295	1.767
	<b>Género</b>	.766	.518	.139	2.151
	<b>Constante</b>	-1.239	.477	.009	.290
<b>Paso 6</b>	<b>Uso de preservativo</b>	-1.448	1.131	.200	.235
	<b>Género</b>	.860	.509	.091	2.363
	<b>Constante</b>	-.898	.329	.006	.407
<b>Paso 7</b>	<b>Género</b>	.754	.496	.128	2.125
	<b>Constante</b>	-.961	.326	.003	.382
<b>Paso 8</b>	<b>Constante</b>	-.654	.242	.007	.520

B= Coeficiente del modelo de regresión logística binaria; Exp(B)= Odd Ratio (OR) o razón de probabilidades; \* Valor de p; \*\* Valor significativo de p ( $p < 0.05$ ).

**ANEXO 9:**

**Coefficientes de las variables evaluadas sobre la ocurrencia de *Ureaplasma spp.***

		<b>B</b>	<b>Error estándar</b>	<b>Sig. (p*)</b>	<b>Exp(B)</b>
<b>Paso 1</b>	<b>Tiene una vida sexual activa</b>	-0.168	.709	.813	.845
	<b>Edad a la que inicio su vida sexual</b>	.259	.160	.105	1.295
	<b>Número de parejas sexuales que ha tenido</b>	.301	.142	.034	1.351
	<b>Uso de preservativo</b>	-0.718	1.131	.525	.488
	<b>Consumo de alcohol</b>	-1.404	.658	.033	.246
	<b>Consumo de tabaco</b>	.535	.832	.520	1.708
	<b>Género</b>	1.952	.672	.004	7.044
	<b>Constante</b>	-6.273	3.018	.038	.002
<b>Paso 2</b>	<b>Edad a la que inicio su vida sexual</b>	.258	.159	.106	1.294
	<b>Número de parejas sexuales que ha tenido</b>	.293	.137	.032	1.340
	<b>Uso de preservativo</b>	-0.754	1.116	.499	.470
	<b>Consumo de alcohol</b>	-1.392	.656	.034	.249
	<b>Consumo de tabaco</b>	.568	.825	.491	1.765
	<b>Género</b>	1.955	.672	.004	7.061
	<b>Constante</b>	-6.365	2.991	.033	.002
<b>Paso 3</b>	<b>Edad a la que inicio su vida sexual</b>	.260	.161	.106	1.297
	<b>Número de parejas sexuales que ha tenido</b>	.304	.135	.024	1.355

	<b>Uso de preservativo</b>	-0.738	1.130	.514	.478
	<b>Consumo de alcohol</b>	-1.421	.653	.029	.241
	<b>Género</b>	1.828	.637	.004	6.223
	<b>Constante</b>	-6.279	3.010	.037	.002
<b>Paso 4</b>	<b>Edad a la que inicio su vida sexual</b>	.278	.159	.080	1.320
	<b>Número de parejas sexuales que ha tenido</b>	.306	.139	.028**	1.357
	<b>Consumo de alcohol</b>	-1.335	.631	.034**	.263
	<b>Género</b>	1.739	.615	.005**	5.692
	<b>Constante</b>	-6.654	2.978	.025	.001

B= Coeficiente del modelo de regresión logística binaria; Exp(B)= Odd Ratio (OR) o razón de probabilidades; \* Valor de p; \*\* Valor significativo de p ( $p < 0.05$ ).