



DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES POR MYCOPLASMA PNEUMONIAE

Muñoz Hiraldo ME. Grupo de Patología Infecciosa de la Asociación Española de Pediatría de Atención Primaria. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por Mycoplasma pneumoniae. Febrero 2014. [Disponible en: <http://www.aepap.org/grupos/grupo-de-patologia-infecciosa/contenido>]

INTRODUCCIÓN

La neumonía adquirida en la comunidad (NAC) es una enfermedad frecuente en la infancia con una incidencia en nuestro país de 30-36 casos/1000 niños menores de 5 años y 11-16 casos/1000 niños mayores de 5 años, siendo necesario el ingreso hospitalario en el 15-23% de los < 5 años con NAC¹. El 20-30% de NAC son causadas por infecciones mixtas (virus-bacteria). El neumococo es la principal bacteria causal. Clásicamente Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia pneumoniae y Legionella se consideran los microorganismos causales de la neumonía bacteriana atípica¹.

Mycoplasma pneumoniae (MN) es responsable del 40% de las NAC en niños mayores de 5 años (principal agente etiológico en este rango)² y el cuarto por orden de prevalencia en los menores de 5 años. Algunos estudios describen cambio en el patrón epidemiológico con aumento de la primoinfección a los 3-4 años de edad, así durante la epidemia de Europa del 2010-11 se registró una alta tasa de infección en < 4 años². Presentaciones más leves (traqueobronquitis) son más frecuentes.

Presenta alta transmisibilidad por gotitas respiratorias que requieren contacto muy próximo. Período de incubación de 3 semanas³. Se observan infecciones en todo el mundo de forma endémica y son más frecuentes durante la primavera y en el paso del otoño al invierno. Cada 3-7 años surgen epidemias cíclicas donde la evolución es más tórpida, se cree debido a bajada de inmunidad de grupo e introducción de nuevos subtipos². Son frecuentes los brotes en colegios e instituciones cerradas⁴. Las tasas de infección secundarias son altas en los contactos familiares.

PATOGÉNESIS

MN es una de las 3 especies del género Mycoplasma patógenas en humanos (MN, M hominis, M genitalium) que se caracteriza por carecer de pared celular, microorganismo más pequeño de vida libre y relación con el huésped de parasitismo^{3,5}. Es una bacteria intracelular facultativa. Se engloban dentro de la clase Mollicutes. Factores de virulencia: MN se adhiere a las células del epitelio respiratorio principalmente por la proteína adhesina P1 (según variaciones en la secuencia genética diferencia en subtipos de MN 1 y 2), produce radicales peróxido de hidrógeno y superóxido, la toxina CARDS, ambos con efectos citopáticos y tiene la capacidad de penetración intracelular dando lugar a una enfermedad crónica^{2,5}.

MN estimula linfocitos B y T e induce la formación de anticuerpos específicos y autoanticuerpos que reaccionan con una variedad de tejidos del huésped y el antígeno I de los eritrocitos, responsable de la producción de las crioaglutininas. Este efecto inmunomodulador sobre el huésped puede causar fenómenos autoinmunes y dar lugar a parte de los síntomas de la infección aguda y de las complicaciones extrapulmonares^{2,3,5}.



Tras la infección, MN puede persistir en tracto respiratorio, quedando como reservorio o estado de portador, a pesar del tratamiento.

La inmunidad producida por la infección no es duradera y las reinfecciones a lo largo de la vida son frecuentes.

CLÍNICA

El 20% de las infecciones son asintomáticas². Los síndromes más comunes son traqueobronquitis, faringitis y otitis. El inicio de la enfermedad es gradual con cefalea, malestar y fiebre no alta. Es característica la tos seca, no productiva. Alrededor de un 10% de los niños desarrollan neumonía con tos que pasa a ser productiva, dolor torácico (característico), subcrepitantes generalizados y pueden auscultarse crepitantes y sibilancias que persisten 3-4 semanas. El 10% de los niños con neumonía presenta exantema maculopapuloso, vesicular o urticarial. Los hallazgos radiográficos son variables, los más comunes son los infiltrados intersticiales difusos, pero puede haber consolidación unilateral, adenopatía hiliar (34%) o derrame pleural (20%)³.

Las manifestaciones extrapulmonares son inusuales en la infancia y debidas a acción directa del germen y a mecanismos inmunes. Consisten en: anemia hemolítica, afectación del SNC (meningitis aséptica, encefalomiелitis aguda desmielinizante, mielitis transversa, neuropatía periférica, ataxia cerebelosa), síndrome de Stevens-Johnson, síntomas gastrointestinales, artralgias y mialgias, artritis, miocarditis, pericarditis y glomerulonefritis^{2,3,5}.

Los pacientes con drepanocitosis, síndrome de Down, inmunodeficiencias y enfermedad cardiopulmonar crónica pueden desarrollar neumonía grave y derrame pleural⁵.

Se postula una **relación del MN con el asma** tanto en mantener una hiperreactividad bronquial crónica como con las exacerbaciones agudas de asma pero hay mayor evidencia en asociarlo con el asma crónico^{2,3}.

JUSTIFICACIÓN

Un diagnóstico específico de la NAC sería esencial para decidir la necesidad y tipo de antibiótico. El diagnóstico de neumonía por MN basado en síntomas y signos es difícil⁶ y puede dar lugar a una prescripción de antibiótico inapropiada (el tratamiento con betalactámicos es ineficaz) y a aumentar la resistencia a antibióticos. No hay hallazgos clínicos ni radiológicos que permitan un diagnóstico seguro de MN frente a neumonía viral o por *C. pneumoniae*³. Según una reciente revisión de la Cochrane (2012) es imposible un diagnóstico certero de neumonía por MN en niños basado en síntomas y signos clínicos⁷. Por tanto, se necesita un test diagnóstico seguro, rápido y coste-efectivo.

Por otro lado el tratamiento de elección del MN son los macrólidos, pero desde el año 2000 se ha aislado un tipo de MN resistente a macrólidos debido a una mutación puntual del gen 23S ARNr, con prevalencia elevada en los últimos años en Asia pero no en nuestro medio (en Francia se ha publicado un 9,8%). En estos casos hay que recurrir a tetraciclinas o quinolonas².



DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

Tradicionalmente el diagnóstico microbiológico se veía limitado por la ausencia de procedimientos rápidos, pero en los últimos años ha cambiado debido a los avances en los métodos de diagnóstico serológico y, sobre todo, por la aplicación de los métodos de amplificación de ácidos nucleicos, comercializados o desarrollados en el propio laboratorio que permiten un diagnóstico microbiológico rápido⁵.

Cultivo de muestra respiratoria

MN requiere un medio de cultivo complejo y su crecimiento es dificultoso. Baja sensibilidad (60%) y tarda 2-3 semanas, por lo que resulta poco práctico con fines diagnósticos y no se realiza de forma rutinaria⁵.

Se ha descrito un método de cultivo rápido (24 horas) en un medio líquido específico para el diagnóstico precoz, basado en cambio de color del medio. Tiene alta sensibilidad y especificidad, aunque menor que la serología⁸. Sin embargo, su uso no se ha extendido en el laboratorio.

Serología

Ha sido y sigue siendo el principal método diagnóstico. La proteína P1 es la diana habitual de respuesta de anticuerpos y el antígeno más usado en técnicas serológicas.

En el individuo inmunocompetente a los 7-9 días de la infección se produce una respuesta rápida de anticuerpos que llega a su máximo en 21-40 días, para ir disminuyendo en meses o años. La respuesta inicial de IgM específica aparece después de la primera semana de infección y puede persistir semanas o meses. La detección de IgM es importante en la población infantil pero no se observa en la población adulta, que generalmente ha sido infectada repetidamente por MN. Así la ausencia de IgM no descarta la infección aguda, ni tampoco su presencia la confirma dado que puede persistir durante 2-3 meses. Los anticuerpos IgG específicos siguen a la respuesta IgM 2 semanas más tarde y permanecen elevados durante un tiempo prolongado de hasta cuatro años. Por tanto, títulos bajos de anticuerpos IgG pueden indicar infección reciente o pasada y en este caso, una segunda determinación a las 2-3 semanas permite demostrar, un aumento de niveles de IgG si existe infección aguda. La producción de anticuerpos puede estar ausente en pacientes inmunodeprimidos^{2,5}.

Las principales desventajas de la serología son el requisito de 2 muestras de suero (fase aguda y convalecencia) para confirmar la seroconversión y la espera de 1-2 semanas desde el inicio de la infección hasta que se desarrollan anticuerpos detectables⁹.

Se han usado diferentes técnicas serológicas:

- **Crioaglutininas:** miden anticuerpos IgM hacia el antígeno I del eritrocito, aparecen en 50-60%. Baja sensibilidad y especificidad, actualmente no se considera útil⁵.
- **Fijación de complemento:** determina conjuntamente IgM e IgG. Es una técnica laboriosa y difícilmente reproducible por lo que no se suele utilizar. Presenta baja sensibilidad (65-90%), especificidad 88-97%, VPP 87% y VPN 89%⁵.
- **Enzimoimmunoanálisis (EIA):** es la técnica que utilizan la mayoría de laboratorios. Permite la cuantificación precisa de IgA, IgM e IgG. Requiere muy poco volumen de suero y puede proporcionar datos específicos de isotipo. En niños la detección de IgM tiene sensibilidad de 81-89%. En adultos refieren VPP 60-80% y VPN de 83-94%. En el



mercado hay una amplia variedad de reactivos comerciales en base a diferentes antígenos con resultados y criterios de interpretación variados. El principal problema es el gold estándar comparativo (la mayoría de autores proponen la PCR pero tiene el inconveniente de los portadores asintomáticos) así como la falta de estandarización entre estudios con diferentes reactivos comerciales^{2,3,5}.

Existe un EIA comercial para detección rápida cualitativa de IgM (Sistema Meridian InmunoCard Mycoplasma IgM[®]) en sólo 10 minutos pero con una sensibilidad variable (60%)^{4,10}.

- **Otras:** aglutinación de partículas sensibilizadas, inmunofluorescencia indirecta, inhibición metabólica.

Técnicas moleculares de diagnóstico rápido

Estas técnicas de laboratorio han desplazado al cultivo, que es menos sensible y mucho más lento. La gran ventaja que aportan es su rapidez, ya que en pocas horas tras la toma de la muestra se puede tener el resultado.

• Técnicas de detección de antígenos

Existen varias y la más usada ha sido el enzimoimmunoensayo (Ag-EIA). Presenta bajas sensibilidad (60-68%) y especificidad debido a reacciones cruzadas, por lo que no se usa.

• Sondas de ADN

Baja sensibilidad. Ambas técnicas no se recomiendan para el diagnóstico.

• Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (NAATs)

Se basan en crear múltiples copias de una secuencia diana del ADN. La mayoría detectan el gen que codifica la adhesina P1 (y subtipos), pero otros equipos utilizan otras dianas, entre ellas el gen de la toxina CARDS. La técnica de preparación de la muestra previa a la técnica es clave y depende de las instrucciones del fabricante y de cada laboratorio. Habitualmente se realiza en muestras respiratorias (nasofaringe, exudado faríngeo) pero se puede realizar en otras (LCR, orina, sangre)^{2,9}.

1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El resultado tarda 2-3 días.

2. PCR en tiempo real (PCR-RT)

Técnica: detecta ADN de MN, con una sonda dirigida a uno o más genes diana y cebadores (primers) específicos para las secuencias flanqueantes, durante el proceso de amplificación usando fluorescencia. Esta técnica, comercial o desarrollada en el laboratorio, ha desplazado a la PCR convencional debido a la precisión, especificidad, menor tiempo con resultados en el día y sensibilidad variable aunque en general elevada⁹.

La existencia de equipos comerciales ha facilitado que esta técnica se introduzca en algunos laboratorios. Proporciona resultados cualitativos (positivo o negativo) o cuantitativos (nº de copias/ml de muestra), en este caso cuanto mayor carga bacteriana, mayor gravedad, por lo que tiene valor pronóstico. La sensibilidad de la técnica depende en gran parte de una correcta



toma de muestra y de una buena extracción de ácidos nucleicos. Se disponen de kits comerciales “monoplex” (detectan ADN sólo de MN) y “multiplex” (detectan simultáneamente diferentes patógenos respiratorios) tanto en Europa como en EEUU. Dentro de los equipos multiplex destacan: 1) los que emplean la PCR a tiempo real, (que suelen detectar MN junto con *C. pneumoniae*); 2) los basados en la tecnología DPO™ (Dual Priming Oligonucleotide), como el sistema Seeplex® PneumoBacter ACE Detection, que detecta 6 patógenos bacterianos; y 3) los basados en microchips arrays, como el *PneumoCLART bacteria*® de Genomica, que incluye la detección de 11 patógenos bacterianos respiratorios, o el Filmarray respiratory® panel que integra de forma automatizada la extracción de ácidos nucleicos, amplificación y detección de hasta 20 patógenos respiratorios bacterianos y virales en un solo proceso que requiere alrededor de una hora. A pesar de la gran sensibilidad y especificidad de estos métodos, una limitación es el elevado coste de los reactivos fungibles, así como el coste de compra o alquiler del equipo necesario para realizar el análisis. Es por ello que el uso en España de estos sistemas queda restringido a algunos grandes hospitales con elevado consumo^{5,9}.

Ventajas: resultado en pocas horas, trabajo técnico mínimo y cada vez más automatizado en los equipos comerciales que usan un aparato termociclador.

Inconvenientes: precio elevado, precisa personal técnico cualificado dentro del laboratorio, se disponen de pocos estudios que comparen si un formato es mejor que otro y resultados dispares cuando se comparan con cultivo o serología.

Los análisis de PCR-RT son instrumento y protocolo específico y es importante que cada laboratorio realice una validación de todos sus pasos antes de aplicarlo^{2,9}.

Interpretación de los resultados

- La presencia de IgM en la población infantil es, en general, indicador de infección aguda, aunque puede persistir meses o incluso años y su detección puede no corresponder con infección reciente.
- La detección de IgG o de inmunoglobulinas totales a título bajo pueden significar una infección pasada o incipiente. Por ello es necesario repetir la determinación en una muestra de suero obtenida al cabo de 3 semanas. Se considera diagnóstico de infección por MN la seroconversión o elevación al menos 4 veces del título de anticuerpos entre las dos muestras⁹.
- Las técnicas de PCR parecen ser los métodos más sensibles para diagnosticar la infección aguda, obtienen resultados positivos (presencia de ADN de MN) en infecciones de pocos días de evolución pero no distingue entre infección aguda y pasada o portadores asintomáticos, si bien en estos últimos casos la cuantificación de ADN será de baja cantidad. La PCR es más sensible al comienzo de la enfermedad (1-7 días) mientras que la serología se hace más sensible a medida que la infección evoluciona. Sin embargo, en la primoinfección la detección de IgM tiene una sensibilidad y una especificidad buenas, mientras que, en las reinfecciones, la falta de detección de IgM específica no permite descartar una infección aguda⁵.
- Ningún test disponible aislado es seguro para atribuir la relación causal del MN¹¹. Un estudio holandés observacional del 2013 en niños de 3 meses a 16 años detecta MN a través de PCR-RT o cultivo y serología en n= 405 niños asintomáticos y n = 321 niños con infección de vías respiratorias inferiores y no encuentra diferencias entre ambos grupos. Aunque tiene limitaciones (tamaño muestra limitado, realizado en una única ciudad) concluyen que la presencia de MN en niños asintomáticos es frecuente

(21,2%) y que las pruebas diagnósticas actuales no diferencian entre portadores e infección sintomática¹². Según diferentes autores la prevalencia de portadores asintomáticos de MN se sitúa entre 5,1% y 13,5%.

- Un meta-análisis del 2011 que incluye 14 estudios comparando PCR con serología en diagnóstico de MN estima para la PCR una sensibilidad inicial de 62% (IC 95%: 45-76%) y una especificidad de 96% (IC 95%: 93-98%). En el análisis por subgrupos los ensayos que utilizan PCR-RT con diana 16s ADN_r y el subgrupo de adultos tienen mejores resultados¹³.

En la tabla 1 se comparan los métodos de diagnóstico microbiológico⁹.

CONCLUSIONES

1. Dado el curso clínico relativamente leve de las infecciones del tracto respiratorio por MN y la buena respuesta general de las neumonías por MN a tratamiento con macrólidos, la falta de una amplia disponibilidad de pruebas de diagnóstico rápido y sus costes asociados, es preferible el tratamiento empírico cuando se sospeche esta entidad (basado en clínica y contexto epidemiológicos)⁹. Según la guía de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América la realización de pruebas diagnósticas para MN tiene recomendación débil y evidencia de moderada calidad¹⁴.
2. Está indicado un diagnóstico microbiológico (incluido PCR si disponible) en^{1,9}:
 - Enfermedad grave que requiere hospitalización
 - Mala respuesta clínica al tratamiento con macrólidos, que puede indicar una cepa resistente
 - Pacientes con comorbilidad subyacente o inmunodeficiencia, en los que es más probable la enfermedad grave y diseminada
 - Si se asocian síntomas extrapulmonares significativos
 - Aparición de brote institucional
3. Los métodos de PCR-RT serían el método diagnóstico etiológico de elección de infección aguda pero con los test disponibles actualmente **no pueden sustituir a la serología**. Son caros, no se encuentran en la mayoría de laboratorios y resultados heterogéneos. Se podría disponer de equipos comerciales automatizados, que precisan poco personal, en algunos laboratorios de urgencias. Son interesantes los equipos múltiples que detectan varios patógenos respiratorios^{5,9}.
4. La **serología** tiene mejor relación coste-efectividad, no requiere instrumentos específicos de PCR y es más probable que esté disponible en la rutina de la mayor parte de laboratorios^{1,2}. En determinadas situaciones (brotes) se puede plantear la prueba rápida de IgM como técnica de cribado para efectuar el diagnóstico presuntivo, presenta aceptables coste y sensibilidad^{4,10}, e incluso se puede realizar en Atención Primaria si se dispone de centrífuga.
5. La combinación de PCR con análisis serológico en niños con síntomas sospechosos de MN se sugiere como el método seguro y rápido para distinguir la colonización de la infección aguda y la diferenciación con otros microorganismos causales de neumonía atípica o viral^{2,5,13}. Cuando se plantee el diagnóstico de laboratorio se debe seleccionar la técnica en función de la disponibilidad y grupo poblacional. Es esencial para el clínico conocer qué le ofrece su laboratorio de referencia, es decir, técnica disponible, cuál es su sensibilidad y su especificidad, y como interpretar los resultados^{2,5}.

Tabla 1. Comparación de los métodos de diagnóstico microbiológico

CRITERIO	DIAGNÓSTICO MOLECULAR	CULTIVO	SEROLOGÍA
Disponibilidad	Algunos equipos de PCR en Europa, Asia y EEUU	Medios de cultivo no disponibles en general	Equipos comerciales de anticuerpos cuali y cuantitativos
Coste	Elevado Requiere personal entrenado en técnicas moleculares	Caro. Se añade el coste de personal por crecimiento lento	Bajo. Variable, depende del volumen de muestras y de los equipos
Tiempo del resultado	Pocas horas	Semanas	Minutos a pocas horas. Requiere 2ª muestra 2-3 semanas
Sensibilidad	Alta. Detecta <100 UFC/ml (algunos 5-50) ó 100 copias genoma	Baja. Puede detectar 100-1000 organismos viables.	Alta si aumento significativo en 2ª muestra. Algo menor que PCR
Especificidad	Alta si gen diana adecuado	Alta (portadores?)	Alta

UFC: unidades formadoras de colonias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Andrés Martín A Moreno-Pérez D, Alfayate Miguélez S, Couceiro Gianzo JA, García García ML, Korta Murua J et al. Etiología y diagnóstico de la neumonía adquirida en la comunidad y sus formas complicadas. *An Pediatr (Barc)*. 2012; 76(3): 162.e1-162.e18.
2. Atkinson TP, Waites KB. *Mycoplasma pneumoniae* Infections in Childhood. *ESPID Reports and Reviews*. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2014; 33(1): 92-94.
3. *Mycoplasma pneumoniae* infection in children. Dori F Zaleznik, Jesus G Vallejo. [Disponible en: <http://www.uptodate.com/contents/mycoplasma-pneumoniae-infection-in-children>]
4. Olavide Sánchez M, Sánchez Pina C, García Bermejo I, Carrasco Sanz A. Brote de neumonía y urticaria por *Mycoplasma pneumoniae* en dos colegios de un municipio de la Comunidad de Madrid. *Rev Pediatr Aten Primaria*. 2008; 10: 627-41.
5. Acosta Boga B, Codina Grau MG, Matas Andreu L, Meseguer Peinado MA. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Mycoplasma* spp. y *Ureaplasma* spp. 2011 [Disponible en: <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia40.pdf>]
6. Community-acquired pneumonia in children: Clinical features and diagnosis. William J Barson. [Disponible en: <http://www.uptodate.com/contents/community-acquired-pneumonia-in-children-clinical-features-and-diagnosis>]
7. Wang K, Gill P, Perera R, Thomson A, Mant D, Harnden A. Clinical symptoms and signs for the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* in children and adolescents with community-acquired pneumonia. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2012, Issue 10. Art. No.: CD009175. DOI: 10.1002/14651858.CD009175.pub2.



8. Ma LD, Chen B, Dong Y, Fan J, Xia L, Wang SZ et al. Rapid mycoplasma culture for the early diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *J Clin Lab Anal.* 2010; 24(4):224-9.
9. Waites KB, Xiao L, Paralanov V, Viscardi RM, Glass JI. Molecular methods for the detection of *Mycoplasma* and *ureaplasma* infections in humans: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology. *J Mol Diagn.* 2012; 14(5):437-50.
10. Lara M. Diagnostico serológico de un brote epidémico de neumonía por *Mycoplasma pneumoniae* en un municipio de Santa Cruz de Tenerife. *Rev Esp Quimioter.* 2013; 26(1): 70-1.
11. Thurman KA, Walter ND, Schwartz SB, Mitchell SL, Dillon MT, Baughman AL et al. Comparison of laboratory diagnostic procedures for detection of *Mycoplasma pneumoniae* in community outbreaks. *Clin Infect Dis.* 2009; 48(9):1244-9.
12. Spuesens EB, Fraaij PL, Visser EG, Hoogenboezem T, Hop WC, van Adrichem LN et al. Carriage of *Mycoplasma pneumoniae* in the upper respiratory tract of symptomatic and asymptomatic children: an observational study. *PLoS Med.* 2013; 10(5):e1001444.
13. Zhang L, Zong ZY, Liu YB, Ye H, Lv XJ. PCR versus serology for diagnosing *Mycoplasma pneumoniae* infection: a systematic review & meta-analysis. *Indian J Med Res.* 2011; 134:270-80.
14. Bradley JS, Byington CL, Shah SS, Alverson B, Carter ER, Harrison C et al. The management of community-acquired pneumonia in infants and children older than 3 months of age: clinical practice guidelines by the Pediatric Infectious Diseases Society and the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2011; 53(7):e25-76.