

**Genotipificación y distribución geográfica de *Mycoplasma pneumoniae*
asociado con Neumonía Adquirida en la Comunidad (NAC) en niños
hospitalizados. Valle de Aburrá (2011-2012)**

ANGELA ROCIO YISETH COPETE RENGIFO

Candidata a Magíster en Microbiología y Bioanálisis con Énfasis en Epidemiología
Molecular Bacteriana

Tutor:

Lázaro Agustín Vélez Giraldo MD, Internista, Especialista en Enfermedades
Infecciosas

Comité Tutorial

Judy Natalia Jiménez Quiceno, MSc; PhD

Zulma Vanessa Rueda Vallejo, MD, PhD

Carlos Garcés Zamudio, MD, Pediatra, Especialista en Enfermedades Infecciosas

Maestría en Microbiología y Bioanálisis

Escuela de Microbiología

Universidad de Antioquia

Medellín

2015

CONTENIDO

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 4 |
| INTRODUCCIÓN | 6 |
| OBJETIVO GENERAL | 16 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 16 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 17 |
| Pacientes | 17 |
| Tratamiento de las muestras clínicas..... | 18 |
| Tipificación molecular de <i>M. pneumoniae</i> mediante gen <i>P1</i> | 18 |
| Descripción de mutaciones en el gen <i>23S rRNA</i> | 19 |
| Ensayo de Reproducibilidad..... | 20 |
| Control de amplificación de las PCR convencional y anidada | 20 |
| Análisis de las secuencias | 20 |
| Georreferenciación de los casos de <i>M. pneumoniae</i> | 21 |
| Consideraciones éticas | 21 |
| Análisis de los datos | 22 |
| RESULTADOS | 23 |
| Detección de <i>M. pneumoniae</i> en los pacientes estudiados..... | 23 |
| Caracterización genotípica de las muestras mediante el gen <i>P1</i> | 24 |
| Detección de mutaciones en el gen <i>23S rRNA</i> | 26 |
| Control de inhibición..... | 27 |
| Ensayo de reproducibilidad..... | 28 |
| Distribución espacial y temporal de los casos NAC por <i>M. pneumoniae</i> | 29 |
| BIBLIOGRAFÍA | 40 |
| LISTA DE TABLAS | 48 |
| Tabla 1: Variantes de <i>M. pneumoniae</i> descritas por diferentes autores en el mundo. ... | 48 |
| Tabla 2: Sitios específicos de las mutaciones puntuales que se presentan en el dominio V del gen <i>23S rRNA</i> de <i>M. pneumoniae</i> | 48 |
| Tabla 3: Cebadores utilizados en la amplificación y caracterización descrita por Dumke <i>et al.</i> | 48 |
| Tabla 4: Características clínicas y sociodemográficas de los niños con NAC positivos para <i>M. pneumoniae</i> incluidos en el estudio..... | 48 |
| Tabla 5: Información de localización y lugar de hospitalización de los niños en los que se detectó el Tipo 1 de <i>M. pneumoniae</i> | 48 |

| | |
|--|----|
| LISTA DE FIGURAS | 48 |
| Figura 1: DNA de esputo amplificado con PCR del gen <i>P1</i> | 48 |
| Figura 2: DNA de HNF amplificado con PCR del gen <i>P1</i> | 48 |
| Figura 3: Distribución de los pacientes positivos por PCR del gen <i>P1</i> y <i>23S rRNA</i> | 48 |
| Figura 4: DNA de esputo amplificado con PCR del gen <i>23S rRNA</i> | 48 |
| Figura 5: PCR de Control de inhibición..... | 48 |
| Figura 6: Reproducibilidad intra-ensayo de la PCR del gen <i>P1</i> | 48 |
| Figura 7: Reproducibilidad intra-ensayo de la PCR del gen <i>23S rRNA</i> | 48 |
| ANEXOS | 49 |
| Anexo 1. Alineamiento múltiple de las secuencias de DNA del gen <i>P1</i> obtenidas al analizar las muestras de esputo inducido e HNF..... | 49 |
| Anexo 2. Alineamiento múltiple de las secuencias de DNA del gen <i>23S rRNA</i> obtenidas al analizar las muestras de esputo inducido e HNF..... | 50 |
| Anexo 3. Representación en el mapa de Medellín de la distribución espacial de los 48 casos de NAC asociados con <i>M. pneumoniae</i> | 52 |
| Anexo 4. Distribución mensual de los casos de NAC asociados con <i>M. pneumoniae</i> . .. | 53 |
| Anexo 5. Representación en el mapa de Medellín de la incidencia de casos de tuberculosis reportados en un estudio previo. | 54 |

RESUMEN

Genotipificación y distribución geográfica de *Mycoplasma pneumoniae* asociado con Neumonía Adquirida en la Comunidad en niños hospitalizados. Valle de Aburrá (2011-2012)

Introducción

M. pneumoniae se encuentra aproximadamente en el 14% de los pacientes con Neumonía Adquirida en la Comunidad (NAC) en el Valle de Aburrá. Se han identificado dos tipos y seis variantes de la bacteria basado en la tipificación del gen *P1*; las variaciones en los genotipos se han asociado con el desarrollo de epidemias de infección respiratoria. Aunque el incremento de cepas con resistencia fenotípica a macrólidos es considerable en algunas regiones del mundo, la información de los genotipos y mutantes resistentes es escasa. En Colombia se desconoce la frecuencia de estos patrones.

Objetivo: Describir las características moleculares y distribución de los casos de NAC por *M. pneumoniae* en niños hospitalizados en instituciones de segundo y tercer nivel de complejidad de Medellín, Bello, Envigado e Itagüí, durante 2011-2012.

Metodología: Se llevó a cabo un estudio transversal en el que se seleccionaron menores de entre 1 mes y 17 años con diagnóstico de NAC por *M. pneumoniae*, hospitalizados en 13 instituciones de cuatro municipios de Antioquia. De cada paciente se recolectaron muestras de esputo inducido e hisopado nasofaríngeo (HNF). En las muestras respiratorias se determinó la distribución de los genotipos de *M. pneumoniae* basado en la comparación de las secuencias del gen *P1*. Adicionalmente, se realizó la caracterización de una región del gen *23S rRNA* que contiene dos mutaciones puntuales asociadas con resistencia a macrólidos. Se realizó la descripción del grupo de estudio. Se determinó la positividad de los genotipos en los dos tipos de muestras recolectadas. Finalmente, se realizó un análisis espacio-temporal para identificar posibles zonas de riesgo y agrupamiento de los casos en el tiempo.

Resultados: se incluyeron 73 niños con diagnóstico clínico-microbiológico de NAC por *M. pneumoniae* con una edad promedio de 2 años; el 56.2% eran hombres, la principal comorbilidad reportada fue asma, y el 21.9% de los pacientes tenían neumonías graves. En 98% de los esputos inducidos y el 89.2% de los HNF disponible se determinó la variante V2a de *M. pneumoniae*, mientras que el Tipo 1 de la bacteria se identificó en 3.9% de los esputos inducidos y 10.7% de los HNF. No se encontraron cepas con mutaciones en el gen *23S rRNA*. Se identificaron dos zonas de riesgo en el mapa de Medellín (zona centro-occidental y nor-oriental), pero no se evidenció una relación temporal entre los casos de *M. pneumoniae*.

Conclusiones: se evidenció un franco predominio de la variante V2a entre los niños diagnosticados con NAC durante el período de estudio. En un grupo menor de pacientes se identificó el Tipo 1, probablemente un nuevo genotipo que comenzaría a circular en los pacientes. No se encontró la presencia de cepas con mutaciones asociadas con resistencia.

INTRODUCCIÓN

Mycoplasma pneumoniae es un procarionta que pertenece al género I de la clase Mollicutes, género en el que se clasifican al menos 102 especies (la gran mayoría de ellas comensales) que se aíslan de humanos, artrópodos, animales vertebrados y plantas (1). Esta bacteria, como todas las especies de esta clase, tiene ciertas características que la diferencian del resto de los procariontas, que en su orden de importancia son: i) generalmente mide menos 1µm de diámetro, por lo que no es posible observarles al microscopio de luz convencional; ii) carecen de genes implicados en la síntesis de la pared celular; en su lugar están rodeadas de una membrana rica en esteroides, principalmente colesterol; y iii) su genoma es pequeño y monomórfico (un solo cromosoma circular que mide entre 0.58-2.2 Mpb y 687 genes), comparado con el genoma de otros procariontas, por ejemplo *Escherichia coli*, que cuenta con 4.300 genes. Además, carece de genes relacionados con la síntesis de compuestos esenciales para la supervivencia (aminoácidos, purinas, pirimidinas, lípidos, ácidos grasos, enzimas y cofactores), lo que hace que sea totalmente dependiente del suministro exógeno de estos compuestos, razón por la cual se le considera un parásito obligado de la especie humana (2–4).

M. pneumoniae se adhiere a la membrana de las células epiteliales del tracto respiratorio por medio de un complejo en forma de capuchón localizado en un extremo polar de su estructura, llamado “complejo de ataque a membrana”. El complejo está conformado por un conjunto de adhesinas (p1, p30, p90) agrupadas en red con proteínas interactivas (p65, p200) y proteínas accesorias (HMW1, HMW2, HMW3) que facilitan la unión con la célula (5–7). De este grupo de proteínas, la adhesina p1 es la de mayor importancia, pues interactúa con mayor especificidad con los receptores de ácido siálico de la membrana celular (5).

La unión de la bacteria con las células del epitelio respiratorio puede generar diferentes manifestaciones clínicas que pueden ser leves, como las infecciones en el tracto respiratorio superior (faringitis y traqueobronquitis) o más complejas como la neumonía (4,8). Se considera que *M. pneumoniae* es la principal causa de

neumonías atípicas adquiridas en la comunidad (NAC atípicas), tanto en niños como en adultos, pues causa entre 10-20% de los casos, entre los cuales alrededor del 18% pueden necesitar manejo hospitalario (9). En un primer estudio realizado en nuestro grupo (Grupo Investigador de Problemas en Enfermedades Infecciosas), en el que se incluyeron 311 adultos hospitalizados con NAC en Medellín, Bello, Envigado, se determinó que 13.8% de ellos tenían evidencia de infección aguda por *M. pneumoniae* (10), recientemente otro estudio de nuestro grupo en el que se incluyeron 525 niños hospitalizados con NAC determinó una proporción similar (13.9%) de casos asociados con *M. pneumoniae* (11). En general, se estima que la incidencia en Medellín y municipios cercanos se encuentra entre 9-14% (11,12), mientras que en Latinoamérica se han reportado incidencias que van del 1.7% hasta el 15.7% (13,14).

Con frecuencia se considera que la neumonía por *M. pneumoniae* se presenta principalmente en los niños en edad escolar (entre los 5 y los 15 años de edad) y adultos jóvenes; sin embargo, esta percepción ha cambiado con el tiempo, pues se observa como cada vez es más variable la epidemiología de la infección y como la bacteria puede afectar personas de cualquier grupo etario (15) .

Las infecciones causadas por *M. pneumoniae* pueden generar complicaciones extrapulmonares en proporción variable; las que afectan el sistema nervioso central son las más frecuentes, y les siguen en su orden las complicaciones dermatológicas y reumatológicas. Las manifestaciones cardíacas y hematológicas son menos frecuentes, y se asocian principalmente con pacientes que padecen condiciones inmunológicas especiales (pacientes con agammaglobulinemias, con inmunodeficiencias innatas o adquiridas, y los esplenectomizados) (16,17). A pesar de la gravedad que puedan tener estas manifestaciones, los signos que producen son poco valorados en la evaluación clínica, puesto que pueden aparecer antes o después, o incluso en ausencia de síntomas pulmonares (1,19,20).

Desde el punto de vista molecular, las cepas de *M. pneumoniae* se pueden clasificar en dos tipos principales (Tipo 1 y Tipo 2) de acuerdo con la secuencia de nucleótidos del gen *P1*, que codifica para la adhesina p1 (3,21,22). En el interior del gen se

encuentran dos regiones repetitivas, RepMP2/3 localizada en la región 3' y RepMP4 en la región 5' que son específicas de genotipo. Se han empleado diferentes técnicas para la tipificación de las cepas aisladas a partir de cultivo, entre las que se encuentran el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), amplificación aleatoria de ADN polimórfico y técnicas basadas en la amplificación de la secuencia del gen *P1* por PCR (3,23,24).

Aunque el genoma de *M. pneumoniae* posee una sola copia del gen *P1*, se han determinado entre ocho a 10 regiones genómicas similares a las secuencias repetitivas dispersas a través del genoma; la importancia de la similitud con estas regiones externas radica en los eventos de reorganización del genoma de *M. pneumoniae*, eventos que se generan por la recombinación homóloga entre los segmentos externos al gen *P1* con las regiones repetitivas, para lo cual la bacteria emplea una enzima similar a la recombinasa RecA (2,25,26). Los eventos de recombinación se han asociado con un rol de inducción de variación antigénica de la superficie celular de *M. pneumoniae*, lo que puede conferir a este "parásito" mecanismos de evasión a la respuesta inmune del hospedero, y la capacidad de generar variantes genotípicas de las cepas de *M. pneumoniae* (27,28).

Los estudios en los que se han demostrado estas variantes presentan en sus resultados aspectos llamativos relacionados con los eventos de recombinación; lo primero es que algunas variantes de *M. pneumoniae* poseen en su secuencia del gen *P1* regiones que tienen alta homología con la secuencia del gen *P1* tanto de las cepas Tipo 1 como Tipo 2 (27). Existe alta homología entre la secuencia de las regiones repetitivas internas en el gen con regiones repetitivas externas a este, que están dispersas a través del genoma de la bacteria (29); por último las mutaciones que se presentan en la secuencia de nucleótidos del gen *P1* de las variantes genotípicas, en algunos casos generan mutaciones en la secuencia de aminoácidos (aa) de la proteína p1. Cuando se compara esta secuencia de aa con la secuencia de aa de las cepas de referencia de los dos tipos de *M. pneumoniae* (M129, Tipo 1 y FH, Tipo 2), se observa que la homología entre ellas puede ser tan alta como del

95% o tan baja como del 25% (23,25–27). En las comparaciones en las que se obtienen porcentajes de homología tan bajos, se puede sugerir que la proteína p1 que se origina de las variantes es muy diferente a la generada por los tipos convencionales de *M. pneumoniae*.

La tabla 1 resume las variantes de *M. pneumoniae* descritas hasta el momento, el año en el que se identificaron, la cepa de la cual fue aislada y la nomenclatura empleada para designar la variante. Las variantes V1 se consideran variantes del Tipo 1, mientras que las V2a, V2b, V2c y V2d y la cepa MP3896 (30) lo son del tipo 2.

Tabla 1. Variantes de *M. pneumoniae* descritas por diferentes autores en el mundo.

| Autor | Año | Cepa del aislamiento | Nomenclatura | Localización de las variaciones en la secuencia del gen P1 |
|----------------------------------|------------|-----------------------------|---------------------|---|
| Kenri T et al. (25) | 1999 | MP309 | V2a | Región repetitiva RepMP2/3 |
| Dorigo-Zetsma et al. (26) | 2001 | MP4817 | V1 | Región repetitiva RepMP 2/3 |
| Dumke R et al. (22) | 2006 | T-103 | V2b | Región repetitiva RepMP 2/3 |
| Pereyre S et al. (27) | 2007 | MP3896 | --- | Región repetitiva RepMP2/3 y RepMP4 |
| Zhao F et al. (24) | 2011 | MP053 | V2c | Región repetitiva RepMP4 |
| Xiao J et al. (29) | 2014 | MP100 | V2d | Región repetitiva RepMP4 |

Dorigo-Zetsma *et al* en 2001 encontraron seis mutaciones puntuales en la variante V1 de *M. pneumoniae* que dieron origen a cambios en la secuencia de aa de la proteína p1 (27). Los cambios de aa se presentaron en los dominios externos de la superficie bacteriana; sin embargo, no tienen relación con las regiones relacionadas con la adherencia a las células epiteliales. El autor también describió una mutación entre las posiciones 1140-1330 (inserción de 190 aa), localizada en el extremo C-

terminal de la proteína p1 de la variante V1, cuya importancia radica en el hecho de que el extremo C-terminal de la proteína p1 es un sitio altamente inmunógeno (31), por lo que se sugiere que la mutación podría contribuir con la evasión a la respuesta inmune del hospedero. Zhao F *et al* también describieron mutaciones puntuales en la secuencia de la región repetitiva RepMP4 del gen *P1* de la variante V2c que dan origen a cambios de aa en la proteína, y adicionalmente demostraron la presencia de una tripleta de nucleótidos (AGT) repetidos en tándem (VNTR) entre las regiones RepMP4 y Rep MP2/3, los que codifican para repeticiones de serinas en la proteína. El autor sugiere que probablemente estas modificaciones estarían relacionadas con cambios en la estructura de la proteína p1 (25).

Los eventos de recombinación parecen favorecer el patrón cíclico de las infecciones causadas por *M. pneumoniae*. En dicho sentido, en diferentes estudios epidemiológicos realizados en Asia, Europa y Estados Unidos (8,32,33) se ha definido un tipo de la bacteria que predomina durante un tiempo y luego se incrementa la circulación del otro tipo en los años siguientes, comportamiento epidemiológico que se ha relacionado con una especie de inmunidad específica que protege a la población contra dicho tipo predominante (34). Una vez sucede la recombinación, las personas quedan expuestas a un tipo diferente al que se ha propagado entre ellos, lo que puede desencadenar brotes de infección respiratoria por la capacidad de *M. pneumoniae* de evadir la respuesta inmune (27).

A pesar de la importancia de los eventos relacionados con la recombinación y detección de variantes genotípicas de *M. pneumoniae*, la información al respecto en el mundo es escasa, entre otras razones porque: i) en muchas no existe una vigilancia sistemática de los casos de infección por *M. pneumoniae*; ii) en las regiones donde se realiza notificación y seguimiento de los casos (Asia y algunos países Europeos (33,35) no disponen de técnicas validadas para el diagnóstico y la tipificación de las cepas clínicas); y por último, el número de estudios de investigación en los que se ha realizado tipificación de las cepas ha sido limitado.

Dada la ausencia de un sistema de vigilancia en Estados Unidos y Latinoamérica los datos locales son aún más escasos. Un estudio reciente realizado por los

Centros para el Control y Prevención de las Enfermedades (CDC) de Atlanta da cuenta de la circulación simultánea de los tipos de *M. pneumoniae* en ocho años de investigación epidemiológica (33), comportamiento similar al reportado por Martínez M. *et al.* entre los años 2005-2006 en Chile, en donde se observó la circulación de ambos genotipos (5/23 (21.7%) de cepas Tipo 1 y 18/23 (78.3%) cepas Tipo 2) durante este período epidemiológico (36). Los resultados de ambos estudios reflejan la circulación de variantes de *M. pneumoniae*, especialmente del Tipo 2.

A lo anterior se suma el hecho de que el diagnóstico de *M. pneumoniae* es difícil, pues debido a que es una bacteria metabólicamente exigente y de crecimiento lento, el cultivo empleado para su aislamiento requiere la adición de sustratos de enriquecimiento y tiempo prolongado de incubación (entre 5-21 días), además de que su sensibilidad es baja (menos del 60%) (37). Por tales razones, en los sitios de atención primaria se emplean técnicas serológicas para el diagnóstico que detectan anticuerpos IgG e IgM, las cuales tienen importantes limitaciones, entre las que se pueden mencionar: i) su baja sensibilidad ($\leq 52\%$); ii) las dificultades para interpretar los resultados por la posible ausencia de respuesta inmune humoral o, en el otro extremo, persistencia de los anticuerpos por meses; y iii) la necesidad de tomar una muestra (serología pareada) en la fase convaleciente de la enfermedad para confirmar la positividad (38). Con el fin de superar estas limitaciones se han desarrollado técnicas de PCR, convencional o en tiempo real, que permiten detectar diferentes genes de *M. pneumoniae*, entre los que se han reportado con mayor frecuencia el gen *P1*, el gen *16S rRNA*, la región espaciadora *16-23S rRNA* y el gen que codifica para la toxina CARDS (síndrome de dificultad respiratorio adquirido en la comunidad-por sus siglas en inglés) (39–44). Estas técnicas de diagnóstico tienen grandes ventajas con relación a las convencionales, pues detectan un número escaso de bacterias en la muestra y su positividad no depende de la viabilidad del microorganismo. Las técnicas de PCR también se emplean en la tipificación de las cepas clínicas de *M. pneumoniae*, mediante protocolos de amplificación del gen *P1*, algunos de los cuales no requieren el aislamiento del microorganismo; de esta forma se reduce el tiempo de obtención de resultados y los costos operativos de la genotipificación, lo que redundaría en beneficio para los

pacientes o grupos poblacionales afectados cuando aumentan inusitadamente los casos de neumonía asociados con la bacteria, o ante la contingencia de brotes epidémicos (23).

Algunas limitantes de las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos están asociadas con su especificidad, pues se ha observado como la proporción de detección de *M. pneumoniae* es similar en pacientes que padecen de una infección respiratoria aguda y aquellos en los que no hay evidencia de síntomas respiratorios (45,46).

Todo lo anterior restringe la posibilidad de conocer la importancia epidemiológica que tienen las infecciones causadas por *M. pneumoniae*; que implicaciones puede tener el tipo causante de la infección en el comportamiento clínico de la enfermedad o la respuesta a la terapia; si la localización de éstos en el tracto respiratorio puede variar; si en un paciente se pueden detectar varios genotipos simultáneamente; y la relevancia que tiene la aparición cada vez más frecuente de variantes de los mismos.

De otro lado, el manejo de las infecciones pediátricas causadas por *M. pneumoniae* se enfrenta actualmente a un nuevo problema, el incremento de cepas resistentes a macrólidos (47–49). Aunque para muchos clínicos el tratamiento antibiótico de las infecciones respiratorias causadas por *M. pneumoniae* no siempre es necesario, sí lo es en muchos pacientes, especialmente aquellos que padecen neumonía (50). Es en esta última circunstancia en la que el problema radica en las limitadas opciones terapéuticas para el tratamiento de los pacientes pediátricos, pues debido a la carencia de pared, la bacteria es intrínsecamente resistente a los betalactámicos, no está indicado el uso de tetraciclinas en pacientes pediátricos (pueden inducir calcificación de los tejidos en formación y decoloración de los dientes) ni fluoroquinolonas (pueden generar toxicidad en los cartílagos), por lo que los macrólidos constituyen la terapia de primera línea en este tipo de pacientes (50–53).

Desde el primer reporte de cepas con mutaciones asociadas con resistencia a macrólidos, realizado por Okazaki *et al* en el año 2001 en Japón (54), en diferentes

regiones del mundo se han detectado cepas resistentes (28,33,35,55–57). La proporción de estas cepas varía de país en país, pero se observan mayores frecuencias en la región asiática. En China, la proporción de estas cepas se encuentra entre 83 y 97% (58,59), en Japón es superior al 50% (35), mientras que en Europa los resultados son muy variables, incluyendo países con proporciones cercanas al 10% y países en los que hasta el momento no se han detectado cepas resistentes (60–62). Los datos del continente Americano provienen de estudios realizados en Estados Unidos y Canadá con proporciones que oscilan entre el 8.2% y el 12% (33,57,63), mientras que en América Latina actualmente no se conocen datos de la circulación de este tipo de cepas.

Las mutaciones que generan la resistencia se presentan espontáneamente en el bucle central del dominio V del gen *23S rRNA* (horquilla de la peptidiltransferasa) de la subunidad ribosomal 50S; las mutaciones presentes en las posiciones A2063 y A2064 son las de mayor importancia, pues es en ellas donde se da la unión específica del macrólido con el dominio V bloqueando la síntesis de proteínas en la bacteria. Otras mutaciones menos frecuentes se presentan en las posiciones A2067 y C2617 que se encuentran cercanas a las posiciones A2063 y A2064 en la estructura secundaria, pero lejos del sitio de interacción con el macrólido (47–50).

Se conoce que las mutaciones en las posiciones A2063 y A2064 confieren altos niveles de concentración inhibitoria mínima a macrólidos (MIC >16µg/ml), mientras que las otras dos mutaciones se relacionan con bajos niveles (49). Las mutaciones que se presentan en las posiciones descritas incluyen transiciones y transversiones, las primeras con mayor frecuencia. La tabla 2 resume los cambios que se generan en estas posiciones.

Tabla 2. Sitios específicos de las mutaciones puntuales que se presentan en el dominio V del gen *23S rRNA* de *M. pneumoniae*

| Posición en el genoma de <i>M. pneumoniae</i> | Nucleótido en la posición | Tipo de mutación | |
|---|---------------------------|------------------|--------------|
| | | Transición | Transversión |
| 2063 | A | G | C,T |

| | | | |
|------|---|-----|-----|
| 2064 | A | G | C |
| 2617 | C | --- | G,A |
| 2067 | A | G | --- |

Algunos estudios han reportado cepas de *M. pneumoniae* en las que están presentes mutaciones en el bucle del dominio II del gen 23S *rRNA* y las proteínas ribosomales L4 y L22, implicadas en conferir resistencia a macrólidos en otras bacterias; sin embargo, no se ha podido establecer la importancia de estas en el desarrollo de resistencia (64,65). Hasta el momento no se han detectado cepas de *M. pneumoniae* resistentes a fluoroquinolonas o tetraciclinas (49).

La importancia clínica de la detección de cepas resistentes se ha relacionado por algunos autores con la persistencia de signos y síntomas como tos y fiebre en comparación con quienes tenían una cepa sensible; además con una mayor frecuencia de complicaciones extrapulmonares y mayor número de días de tratamiento antibiótico requerido. A pesar de la importancia de estos resultados, se observa que éstos se obtuvieron con un número muy bajo de pacientes, lo que deja en duda la aplicación de los mismos (66–70). Sin embargo, otros estudios coinciden en que las cepas de *M. pneumoniae* resistentes a macrólidos no generan un incremento en la gravedad de las infecciones en niños o adultos. Esta razón, aunada al hecho de que la fatalidad de las infecciones por *M. pneumoniae* es rara, explica porque muchos clínicos no modifican la conducta terapéutica inicial aún después de conocer la presencia de un genotipo que sugiere resistencia (50,51,61).

Cada vez más los estudios epidemiológicos contienen información relacionada con la distribución espacial de los eventos que se investigan en un sitio geográfico determinado, para lo cual existen diferentes plataformas, algunas de ellas en la web, que permiten vigilar permanentemente los eventos y generar mapas que ayudan con la visualización y el análisis de los datos epidemiológicos, por ejemplo monitorear la diseminación de clones exitosos en ciudades, países o incluso internacionalmente, o el seguimiento en tiempo real de eventos de interés en salud (71,72).

El presente trabajo pretende obtener datos que aporten información sobre el patrón de circulación de los genotipos de *M. pneumoniae* en la ciudad de Medellín y municipios cercanos, con el fin de contrastar las cepas obtenidas con los genotipos que circulan en otros países. A nuestro saber, este es uno de los primeros estudios que en América Latina explora la circulación de los genotipos de la bacteria y el perfil de susceptibilidad genotípica de estas cepas de *M. pneumoniae*. Además, busca realizar una primera aproximación al uso y aplicación de las herramientas de sistemas de información geográficos (SIG) en el análisis de la distribución de los casos de neumonía, tomando como modelo los que son causados por *M. pneumoniae*.

OBJETIVO GENERAL

Describir las características moleculares y distribución de *M. pneumoniae* en niños hospitalizados por NAC en instituciones de segundo y tercer nivel de complejidad de Medellín, Bello, Envigado e Itagüí, y explorar la concordancia de los genotipos entre las muestras respiratorias utilizadas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la diversidad genotípica de *M. pneumoniae* en muestras de esputo inducido e hisopado nasofaríngeo (HNF).
2. Comparar si existen diferencias entre los genotipos identificados en las muestras de HNF y esputo inducido.
3. Describir en la población estudiada la frecuencia de genotipos de *M. pneumoniae* asociados con resistencia a macrólidos.
4. Explorar la distribución espacial y temporal de los casos de *M. pneumoniae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

Los pacientes de este estudio provienen del estudio macro “Caracterización clínica y etiológica de la Neumonía Adquirida en la Comunidad (NAC) en niños hospitalizados en el área metropolitana de Medellín 2011-2013”, financiado por COLCIENCIAS, con código 111534319142, en el cual se incluyeron 525 niños entre 1 mes y 17 años con diagnóstico clínico-radiológico de NAC que estuvieran hospitalizados en 13 centros de atención de segundo y tercer nivel de las ciudades de Medellín, Bello, Envigado e Itagüí, y cuyo objetivo principal era identificar los agentes etiológicos de la NAC en la población pediátrica. En dicha investigación se excluyeron niños con inmunodeficiencias primarias o adquiridas grave, fibrosis quística, neumopatía crónica de origen no infeccioso, alteraciones neurológicas (parálisis cerebral o neuromuscular degenerativas) o psiquiátricas que impidieron la firma del asentimiento informado, trastornos congénitos del metabolismo, bronquiolitis (primer episodio sibilante en menor de 2 años), neoplasias hematológicas, granulocitopenia <500 células/mm³, y trastorno congénitos de las ciliadas.

Entre los 525 niños, la presente investigación tomó a todos los niños a quienes se les diagnosticó microbiológicamente neumonía por *M. pneumoniae*. Es un estudio transversal retrospectivo.

El diagnóstico microbiológico de NAC por *M. pneumoniae* se definió por dos criterios: i) incremento de 4 veces el título de anticuerpos IgG y/o IgM en el suero de la fase convaleciente con respecto a la fase aguda, siempre y cuando estos valores superaran el umbral de positividad (>11) descrito por el estuche comercial (*Mycoplasma pneumoniae* ELISA IgG/IgM®, Vircell, España); y ii) detección del DNA de *M. pneumoniae* por una PCR multiplex comercial (Seeplex® Pneumobacter ACE Detection, Seegen, Corea), que detecta también otros cinco patógenos

respiratorios en la misma reacción de amplificación (*Streptococcus pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Chlamydomphila pneumoniae*).

Los pacientes incluidos cuentan con los datos clínicos, epidemiológicos, de laboratorio, terapéuticos y de seguimientos consignados en una base de datos diseñada para el estudio macro.

Tratamiento de las muestras clínicas

Todos los pacientes de este estudio tenían una muestra de esputo inducido y otra de HNF que fueron recolectadas por personal entrenado siguiendo protocolos operativos estandarizados; luego de su recolección las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su procesamiento. Con el fin de minimizar la probabilidad de degradación de los ácidos nucleicos, se evitaron descongelaciones repetidas.

La extracción de DNA se realizó a partir de 500µL de la solución salina en la que se encontraba almacenado el HNF y 500 µL de muestra de esputo previamente tratada con NALC/NaOH al 2%, para lo cual se utilizó el protocolo de extracción de DNA a partir de muestras de tejidos descrito en el estuche DNAeasy Blood and Tissue, (QIAGEN®, Hilden, Alemania).

Se incluyó un control negativo de extracción con cada grupo de muestras, para determinar posibles casos de contaminación.

Tipificación molecular de *M. pneumoniae* mediante gen *P1*

Para la tipificación con el gen *P1* se estandarizó el protocolo de PCR anidada descrito por Dumke *et al* (23), en el que se usan 2 juegos de cebadores (Tabla 3) que amplifican un segmento de la región repetitiva RepMP2/3 del gen.

Tabla 3. Cebadores utilizados en la amplificación y caracterización descrita por Dumke *et al.*

| Ronda de PCR | Cebadores | Secuencia | Tamaño del fragmento en pb |
|--------------|-----------|-------------------------------|----------------------------|
| Primera | Mp5f | 5´ TTGACAAGA CCGTCC AATCC | 2.465 |
| | Mp16r | 5´ TTGGTTGGGTATCTT GATCAGG | |
| Segunda | Mp11f | 5´ CCTCGTTGTCAG TGGCACC | 533 |
| | Mp14r | 5´ GCTGGGTGGAAT GGTCTGTAC | |

De acuerdo con las condiciones iniciales descritas por el autor, se modificaron las concentraciones de MgCl₂ en la primera y segunda ronda (2mM y 2.5mM, respectivamente) y de dNTPs (0.2mM en ambas rondas), hasta obtener un protocolo definitivo con el que se amplificó el DNA de las muestras de esputo inducido e HNF.

Descripción de mutaciones en el gen 23S rRNA

Para identificar las mutaciones puntuales en el dominio V del gen 23S rRNA (asociadas con resistencia a macrólidos), se estandarizó la PCR convencional descrita por Chironna *et al* (56), que amplifica una región de 217 pb en la que se incluyen las posiciones 2063 y 2064, que dan cuenta del 95% de las mutaciones presentes en esta región del gen. A diferencia del protocolo propuesto por el autor se empleó una temperatura de alineamiento de los cebadores de 58.2°C

Mediante un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) se corroboró que las secuencias de los productos obtenidos al amplificar el DNA de la cepa *M. pneumoniae* FH 15531 de Eaton Agent, obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC®, Virginia, USA) con ambas PCR, alineaban con regiones de aproximadamente 500 pb del gen *P1* y 200 pb del gen 23S rRNA. De igual forma se verificó mediante BLAST que los cebadores empleados en ambos protocolos de PCR reconocieran las regiones de interés y que no reaccionaran cruzadamente con otros microorganismos.

Con cada ensayo de PCR se incluyó un control positivo (DNA cepa *M. pneumoniae* FH 5531, ATCC®) con una concentración de 3.1×10^{-6} ng/ μ L y un control negativo (agua ultrapura).

Los productos de las reacciones de PCR se revelaron mediante electroforesis en gel de agarosa (AMRESCO®, USA) al 2.5% teñido con EZ-VISION™ (AMRESCO®, USA), en una corrida de 60 minutos a 70 voltios y se corroboró que el tamaño aproximado de la banda observada correspondiera con el tamaño del fragmento esperado.

Ensayo de Reproducibilidad

Para evaluar la reproducibilidad intra e inter ensayo de los dos protocolos de PCR realizados en el estudio, se amplificó el DNA extraído de tres muestras (dos esputos inducidos y un HNF) en tres ocasiones diferentes un mismo día (reproducibilidad intra-ensayo), y se amplificó el DNA en tres días consecutivos (reproducibilidad inter-ensayo).

Control de amplificación de las PCR convencional y anidada

Para descartar la presencia de inhibidores en las reacciones de PCR en las que se obtuvo un resultado negativo tanto para el gen *P1* como *23S rRNA*, se amplificó el gen que codifica para la Gliceraldeido-3-fosfato-deshidrogenasa (GADPH) humana como control de inhibición, siguiendo las descripciones del protocolo comercial (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific) y los productos se visualizaron en gel de agarosa como se describe previamente.

Análisis de las secuencias

Todos los productos de PCR obtenidos tras la amplificación del gen *P1* y *23S rRNA* se purificaron, y secuenciaron ambas cadenas con los cebadores empleados en cada una de estas (MacroGen® (Seoul-Corea). Para determinar el Tipo de *M. pneumoniae* se realizó un alineamiento múltiple empleando Clustal W; se

compararon las secuencias consenso con las secuencias del gen *P1* de las cepas de referencia de *M. pneumoniae* M129 (M18639) y FH (AF290002.1) y de las variantes V1 (AF290000.1), V2a (AB024618.1) y V2b (DQ 383277.1), de acuerdo con la clasificación propuesta por Dumke *et al* (73). La descripción de mutaciones en las posiciones 2063 y 2064 del gen *23S rRNA* se realizó al comparar en un alineamiento múltiple las secuencias consenso con la secuencia del gen *23S rRNA* de *M. pneumoniae* (X.68422).

Georreferenciación de los casos de *M. pneumoniae*

Mediante el programa ArcGis se georreferenciaron los casos de NAC por *M. pneumoniae* que se encontraban ubicados en el área urbana de Medellín. Se aplicaron los estadísticos globales de Moran's I y Getis-Ord para explorar la existencia de agrupación espacial de los casos a diferentes distancias, y los estadísticos espaciales locales de Morans I y Getis Gi para localizar gráficamente los barrios o comunas con un mayor número de casos. Se exploró la distribución mensual de los casos de *M. pneumoniae*, para determinar si durante el período de estudio se presentó un aumento de casos durante un tiempo específico.

Consideraciones éticas

Durante la captación de los niños del estudio, los médicos brindaron a los padres de familia y/o tutores la información pertinente sobre la enfermedad y el estudio, y sobre lo que implicaba su participación; y cuando aceptaban participar, ellos firmaban un consentimiento informado. Además, cuando el menor tenía más de 7 años, se le solicitó a él la firma de un asentimiento. En el presente estudio solo se incluyeron aquellos pacientes que también autorizaron en un consentimiento adicional, el uso de sus muestras en otros proyectos diferentes al que originalmente fueron invitados a participar.

Esta investigación cuenta con el aval del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia (Acta N° 001, del año 2015).

Análisis de los datos

Todos los análisis se realizaron en el paquete estadístico SPSS® versión 22.0. Se describió la frecuencia de los genotipos de *M. pneumoniae* en muestras de esputo inducido e HNF, se realizó una diferencia de proporciones para estimar la frecuencia de genotipos identificados en cada una de las muestras y se calculó el acuerdo entre los genotipos detectados en esputo inducido e HNF; de igual forma se reportó la proporción de cepas con mutaciones asociadas con resistencia.

Por último se estimó la correlación espacial y temporal de los casos y genotipos de *M. pneumoniae*, mediante estadísticos espaciales y análisis de conglomerados, respectivamente.

RESULTADOS

DetECCIÓN DE *M. pneumoniae* EN LOS PACIENTES ESTUDIADOS

Entre los 73 pacientes incluidos, el 75% de los pacientes tenía menos de 4 años y 56.1% de ellos eran de sexo masculino, la comorbilidad más importante fue la presencia de asma (23,3%), y de acuerdo con los criterios de gravedad de la neumonía de la Organización Mundial de la Salud, se determinó una proporción de 21.9% de pacientes graves y 1.4% muy graves. En la tabla 4 se observan las características clínicas y sociodemográficas evaluadas en los pacientes.

En este grupo de pacientes se halló evidencia de infección por *M. pneumoniae* por PCR en 54/73 (73.9%), y cuadruplicación de anticuerpos IgG y/o IgM en serología pareada en 33/73 (45.2%) niños. De los 54 niños con PCR positiva, 14 también cuadruplicaron títulos para IgG y/o IgM por serología pareada. Los 40 restantes fueron positivos únicamente por PCR.

Las características clínicas y socio-demográficas de los 54 pacientes en los que se obtuvo un resultado positivo para la PCR del gen *P1* o *23S rRNA* fueron similares a las de los 73 pacientes iniciales, lo cual denota que los resultados de la tipificación obtenidos en estos pacientes, representan lo que sucede en el grupo de pacientes iniciales (Tabla 4).

Tabla 4. Características clínicas y sociodemográficas de los niños con NAC positivos para *M. pneumoniae* incluidos en el estudio.

| Característica | Niños con NAC positivos para <i>M. pneumoniae</i> (n=73) | Niños con PCR del gen P1 o 23S rRNA positiva (n=54) |
|--|--|---|
| Edad en años, Me (Riq) | 2,0 (1,0-4,0) | 3,0 (2,0-4,0) |
| Masculino: Femenino n (%) | 41 (56,2): 32 (43,8) | 28 (51,9):26 (48,1) |
| Tabaquismo pasivo, n (%) | 32 (43,8) | 22 (66,7) |
| N° de personas que conviven con el menor, Me (Riq) | 5,0 (4,0-6,0) | 5(4,0-6,0) |
| Asistencia a guarderías, n (%) | 50 (68,5) | 38 (70,4) |
| Días de síntomas, Me (Riq) | 3,0 (2,0-6,0) | 4 (3,0-7,0) |
| Días de hospitalización, Me (Riq) | 4,0 (3,0-7,0) | 4 (3,0-7,0) |

| | | |
|---|-----------|-----------|
| Comorbilidades | | |
| Asma, n (%) | 17 (23,3) | 14 (25,9) |
| Síntomas | | |
| Tos, n (%) | 71 (97,3) | 52 (96,3) |
| Fiebre, n (%) | 68 (93,2) | 50 (92,6) |
| Disnea, n(%) | 53 (72,6) | 40 (74,1) |
| Expectoración, n (%) | 31 (42,4) | 19 (35,2) |
| Signos | | |
| Conciencia alterada n(%) | 1(1,4) | 1(1,9) |
| Aleteo nasal n(%) | 4(5,5) | 3 (5,6) |
| Adenopatías n(%) | 3 (4,1) | 3 (5,6) |
| Derrame pleural n(%) | 2(2,7) | 1 (1,9) |
| Gravedad de la neumonía | | |
| Moderada n(%) | 56(76,7) | 42 (77,8) |
| Grave n(%) | 16 (21,9) | 11 (20,4) |
| Muy grave n (%)n(%) | 1(1,4) | 1(1,9) |
| Confección con otros patógenos respiratorios n (%) | 55(75,3) | 40(74,1) |

*La gravedad de la neumonía se determinó de acuerdo con los criterios de clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Caracterización genotípica de las muestras mediante el gen *P1*

De los 73 pacientes con diagnóstico de *M. pneumoniae*, 53 fueron positivos para la PCR del gen P1 con las condiciones estandarizadas de la PCR de Dumke *et al* (Figura 1 y 2), 30 lo fueron en HNF y esputo inducido, 22 solo en esputo inducido y un paciente solo en HNF (Figura 3).

Se analizaron las 52 secuencias disponibles de las muestras de esputo inducido y 28 de las 31 de HNF. La variante V2a de *M. pneumoniae* se identificó en 50/52 (96.2%) secuencias obtenidas de esputos inducidos y en 25/28 HNF (89.3%). Por su parte, el Tipo 1 de *M. pneumoniae* se identificó en 2 esputos inducidos (3.8%) y 3 (10.7%) HNF (Figura 1). En solo uno de los 28 pacientes que tenían el resultado en ambas muestras disponibles, se observó discordancia entre el genotipo encontrado en el esputo inducido (variante V2a) del identificado en el HNF (Tipo 1).

No se observó relación epidemiológica entre los pacientes que tenían el Tipo 1 de *M. pneumoniae* (uno de ellos positivos en esputo y dos en HNF), pues el momento de inclusión en el estudio entre un paciente y otro difirió más de 20 días, los tres residían en sitios diferentes del Área Metropolitana y estuvieron hospitalizados en diferentes instituciones de salud. Debido a que solo fueron 3 pacientes con el Tipo 1 y los restantes tenían la Variante V2a no es adecuado hacer comparaciones estadísticas.

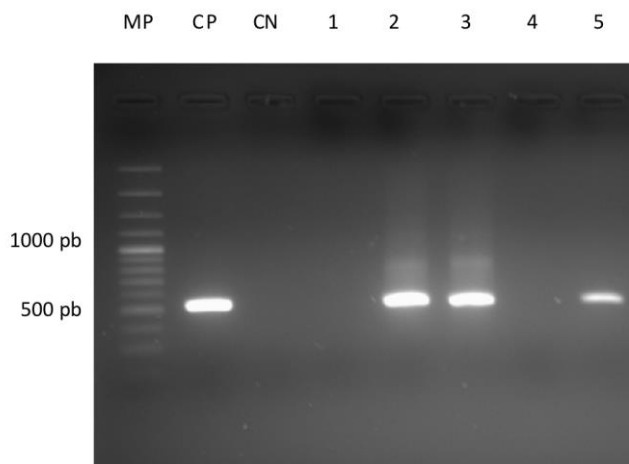


Figura 1. DNA de esputo amplificado con el protocolo de PCR del gen *P1*. **CP:** Control positivo **CN:** Control negativo; **MP:** marcador de peso molecular; **2, 3, 5:** muestras positivas. **1, 4:** muestras negativas.

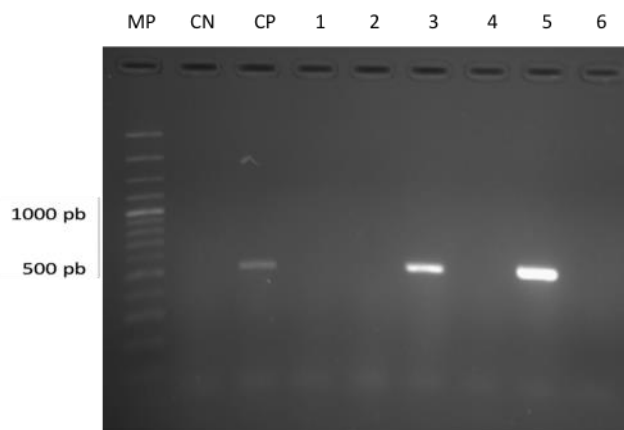


Figura 2. DNA de HNF amplificado con el protocolo de PCR del gen *P1*. **CP:** Control positivo. **CN:** Control negativo. **MP:** Marcador de peso molecular. **3, 5:** muestras positivas. **1, 2, 4, 6:** muestras negativas.

Figura 3. Distribución de los casos positivos con las PCR del gen *P1* y *23S rRNA* en muestras de esputo inducido e HNF.

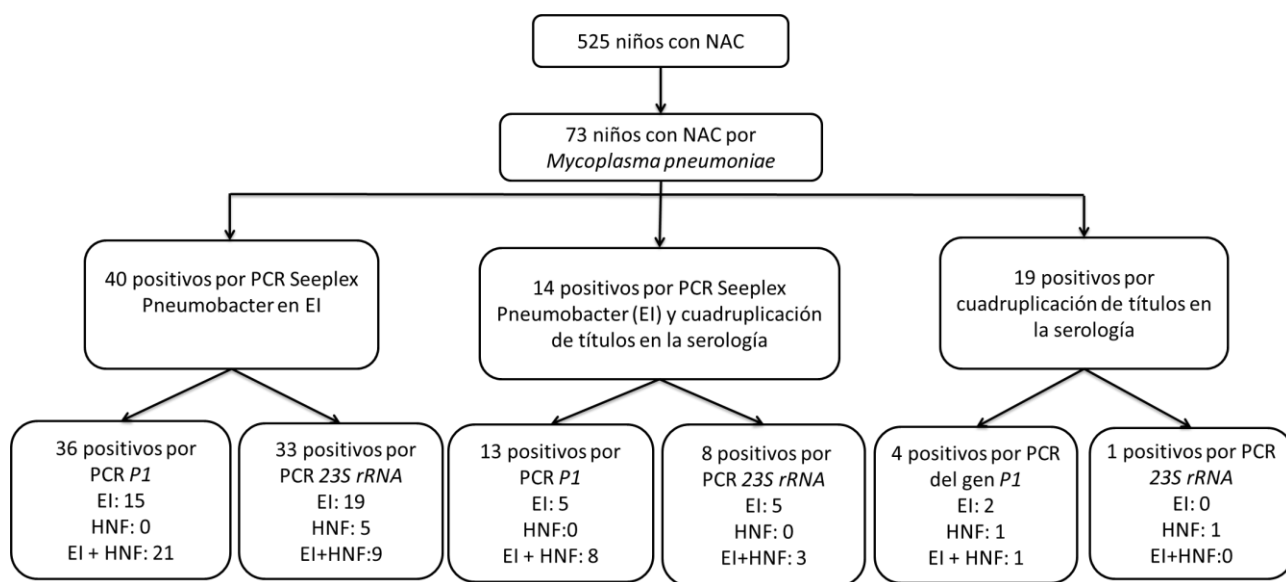


Tabla 5. Información de localización y lugar de hospitalización de los niños en los que se detectó el Tipo 1 de *M. pneumoniae*

| | Paciente 1 | Paciente 2 | Paciente 3 |
|---------------------------------------|-----------------------------|-------------------|-----------------|
| Fecha de ingreso al estudio | 06/03/2012 | 10/10/2011 | 30/10/2011 |
| Barrio de residencia | Bello | La Milagrosa | Doce de Octubre |
| Lugar de procedencia | Bello | Medellín | Medellín |
| Institución de hospitalización | Hospital Marco Fidel Suárez | Clínica León XIII | Clínica Soma |

Detección de mutaciones en el gen *23S rRNA*

Se logró amplificar esta región del genoma en 42 pacientes con las condiciones descritas por Chironna *et al.* (Figura 3), 6 solamente en HNF, 24 en esputo inducido y 12 en ambas muestras (Figura 1).

Se analizaron todas las secuencias de los 36 productos de PCR disponibles de la amplificación del DNA presente en los esputos inducidos y en 17/19 secuencias obtenidas de la amplificación de los HNF. En este grupo de niños no se encontraron

cepas que albergaran mutaciones asociadas con resistencia a macrólidos (Anexo 2).

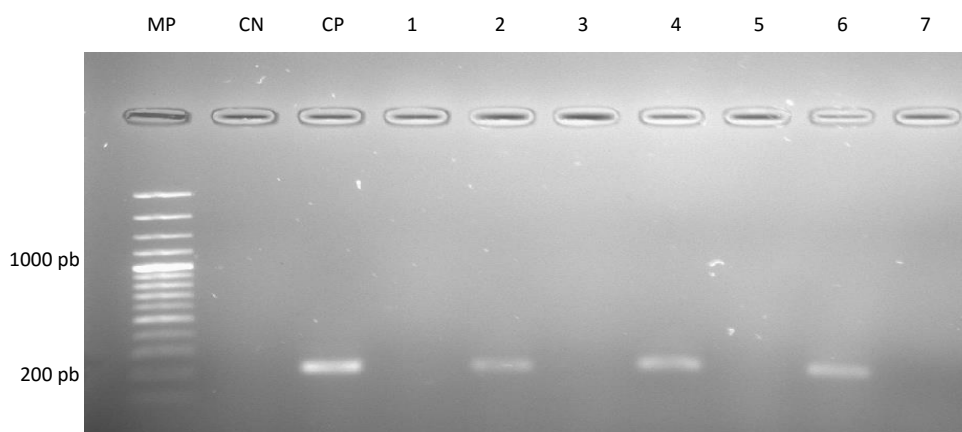


Figura 4. DNA de esputo amplificado con PCR del gen *23S rRNA*. **CN:** Control negativo; **MP:** Marcador de peso molecular **CP:** Control positivo; **1, 3, 5,7:** muestras negativas; **2, 4,6:** muestras positivas.

Control de inhibición

Se evaluaron 60 muestras (20 esputos inducidos y 40 HNF) que tuvieron un resultado negativo tanto para la PCR del gen *P1*, como del gen *23S rRNA*. En 52/60 muestras evaluadas se observó una banda específica de 496 pb correspondiente al producto de PCR esperado de la amplificación del gen que codifica la GADPH humana. En las ocho muestras restantes en las que se tuvo un resultado negativo, se realizó nuevamente la extracción del DNA; sin embargo, cuando se amplificaron nuevamente con los protocolos para el gen *P1* y *23S rRNA*, las ocho muestras tuvieron nuevamente resultados negativos con ambos protocolos, lo que conduce a concluir que probablemente el DNA presente en estas muestras se degradó por efecto de la congelación prolongada de las mismas o en su defecto, el resultado negativo en ambas PCR pudiera atribuirse a que el DNA de *M. pneumoniae* no estuvo presente en la reacción de amplificación.

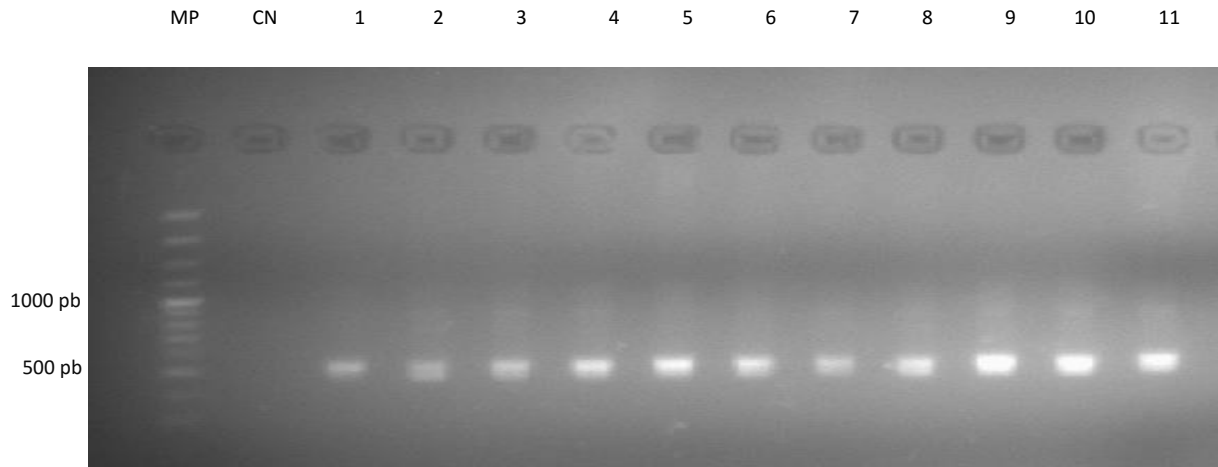


Figura 5. Resultados positivos de la PCR de Control de inhibición. **CN:** Control negativo; **MP:** marcador de peso molecular **1-11:** DNA de esputo inducido o HNF amplificado con el protocolo del gen que codifica para la GADPH humana.

Ensayo de reproducibilidad

Las PCR del gen *P1* y *23S rRNA* fueron reproducibles al amplificar el DNA extraído de tres muestras respiratorias cuando se corrieron simultáneamente en 3 reacciones (reproducibilidad intra-ensayo, figura 5 y 6) y en tres días diferentes (reproducibilidad inter-ensayo, imágenes no mostradas).

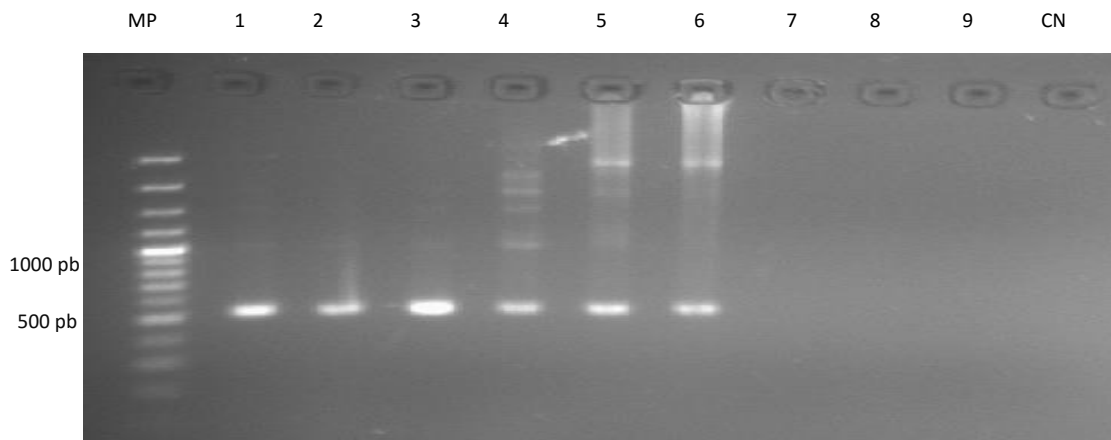


Figura 6: Reproducibilidad intra-ensayo de la PCR del gen *P1*. **MP:** Marcador de peso molecular; **CN:** Control negativo; **1-3:** Muestra 1 positiva, corrida en 3 reacciones; **4-6:** Muestra 2 positiva, corrida en 3 reacciones; **7-9:** Muestra 3 negativa, corrida en 3 reacciones.

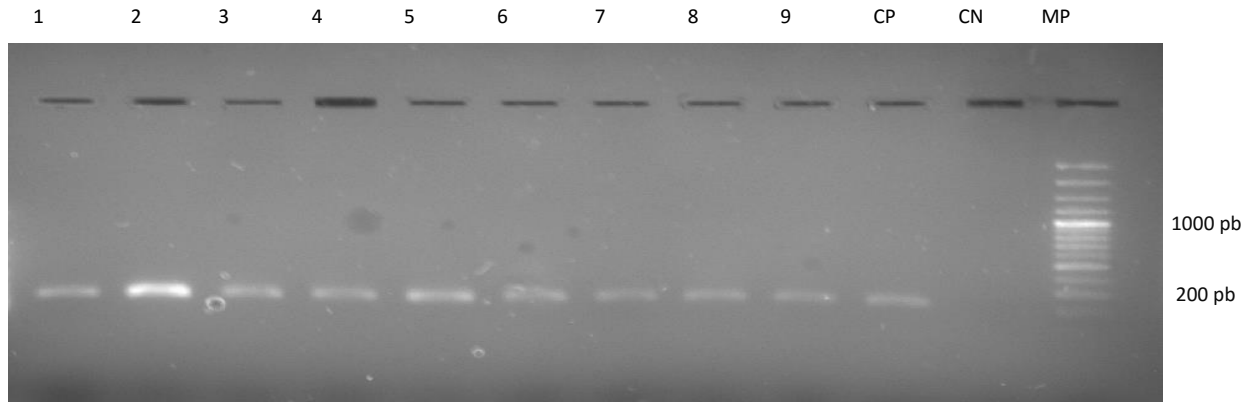


Figura 7. Reproducibilidad intra-ensayo de la PCR del gen *23S rRNA*. **MP:** Marcador de peso molecular; **CP:** control positivo; **CN:** Control negativo; **1-3:** Muestra 1 positiva, corrida en 3 reacciones; **4-6:** Muestra 2 positiva, corrida en 3 reacciones; **7-9:** Muestra 3 positiva, corrida en 3 reacciones.

Distribución espacial y temporal de los casos NAC por *M. pneumoniae*

Se realizó la georreferenciación de 48 niños con NAC por *M. pneumoniae* que tuvieron disponible la dirección de residencia y que estaban ubicados en el área urbana de Medellín. Cuando se situaron en el mapa de esta ciudad, se evidenciaron agrupaciones y sitios de mayor riesgo en 15 barrios de la zona centro-occidental y nororiental de la ciudad (Anexo 3). No se evidenció un aumento considerable de casos de NAC por *M. pneumoniae* en un momento específico durante el tiempo de estudio (Anexo 4).

DISCUSIÓN

Las infecciones respiratorias asociadas con *M. pneumoniae* con frecuencia son descritas en pacientes que superan los 5 años de edad (pacientes en edad escolar) (74), pero a diferencia de esta descripción, la edad promedio de los niños incluidos en el presente estudio fue de 2 años, resultados coincidentes con los encontrados recientemente por Spuessens *et al* (45) en una cohorte de 321 niños con infecciones del tracto respiratorio inferior en los que se detectó *M. pneumoniae* (edad promedio de los pacientes 2.65 años). De acuerdo con este comportamiento epidemiológico de la enfermedad se puede asumir que *M. pneumoniae* causa neumonía en todos los grupos de edad, y por tanto, es importante incluir a los niños menores de 5 años como un grupo poblacional en el que también es necesaria la búsqueda e identificación de este patógeno.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, la variante V2a predominó entre los niños con NAC en los que se detectó *M. pneumoniae*, variante de lejos más frecuente que el Tipo 1, el otro genotipo detectado en el medio. Desde su descripción en el año 1999 (26), se han reportado diferentes variantes del Tipo 2 de la bacteria en estudios realizados en diversos sitios geográficos. Estas variantes se generan por eventos de recombinación homóloga entre las regiones repetitivas del gen *P1* y regiones similares a estas, que se encuentran distribuidas en el genoma de la bacteria (25,26). En nuestro estudio, la variante V2a se encontró en una proporción mucho más alta (98% en muestras de esputo inducido y 89.2% en muestras de HNF), que la descrita en los reportes previos provenientes de países desarrollados como Alemania y Japón (23,26,73). Incluso nuestros resultados distan mucho de los obtenidos por Martínez *et al* en Chile, quienes observaron en un año de estudio, la circulación de cepas Tipo 1 (78.3%) y Tipo 2 (21.7%) de *M. pneumoniae* y una pequeña proporción de variantes del Tipo 2; sin embargo, los autores no reportaron la variante obtenida ni los resultados derivados de la secuenciación (36).

Las diferencias observadas con estos hallazgos podrían ser explicadas por las variaciones geográficas en los patrones de circulación de los genotipos de *M. pneumoniae*, pues la variante V2a se ha detectado en iguales proporciones en pacientes adultos y pediátricos, entre individuos hospitalizados y aquellos que no requieren hospitalización, así como en diferentes muestras respiratorias, lo que sugiere que su distribución no está ligada a algún aspecto particular de la enfermedad. Nuestros resultados, al igual que los reportados por Dumke *et al*, tampoco sugieren que exista una relación significativa entre la detección de la variante V2a con la presentación clínica de la neumonía o signos y síntomas particulares de los pacientes (73). De igual manera no se observaron diferencias entre los pacientes en los que se describió esta variante con aquellos que tenían el Tipo 1.

Sin embargo, es importante resaltar que, desde su reporte en el año 1999, la circulación de la variante V2a, al igual que la de otras variantes del Tipo 2 de *M. pneumoniae* (V2b y V2c), ha aumentado considerablemente desde proporciones cercanas al 2,0% hasta el 19,4% de las cepas de *M. pneumoniae* analizadas por Dumke *et al* en el año 2006 (23). De igual forma, el mismo autor en el año 2010, documentó que esta variante estaba presente hasta en el 43% de las muestras positivas para *M. pneumoniae* recolectadas de pacientes adultos con NAC atendidos en 6 centros de atención primaria de Alemania (73).

Recientemente Xiao *et al* describieron una nueva variante del Tipo 2, la variante V2d que se aisló de la cepa MP100 de *M. pneumoniae* (30). La secuencia de la región repetitiva RepMP4 de la variante V2d tenía regiones similares a la variante V2a, pero diferían en una región de 142 pb que era similar a una externa del gen *P1*; de igual manera los hallazgos reportados por Zhao *et al*, sobre la variante V2c demuestran que ésta es similar a la variante V2a, pero diferían en una región de aproximadamente 82 pb, que tenía homología del 100% con el elemento repetitivo RepMP4-7 que se encontraba por fuera del gen *P1* (25). Teniendo en cuenta que las variantes V2c y V2d se describieron después de la variante V2a, se puede

asumir que estas nuevas variantes se generaron por eventos de recombinación homóloga en la variante V2a.

Las primeras variantes descritas de *M. pneumoniae* (del Tipo 1 y 2) presentaban únicamente mutaciones en su región RepMP 2/3 (23,26,27); sin embargo, las variantes del Tipo 2 reportadas recientemente tienen mutaciones únicamente en su región RepMP4, lo que sugiere que esta región repetitiva se ha convertido en un reservorio para el desarrollo de eventos de recombinación que dan origen a nuevas variantes del Tipo 2 de la bacteria (25,28,30). Más allá de las variaciones que se presentan en la secuencia de nucleótidos de las regiones repetitivas, están las variaciones en la secuencia de aa de la proteína p1 que se identifican cuando se compara con la secuencia de las cepas de referencia, Tipo 1 y 2 de *M. pneumoniae*, (M129 y FH respectivamente). Las variaciones en el porcentaje de homología entre las secuencias de aa de las variantes con la de los dos tipos, sugiere que algunos cambios pueden dar origen a mutaciones en la estructura de la proteína p1, que le permiten a la bacteria, evadir la respuesta inmune.

M. pneumoniae se considera una especie muy homogénea, con pocas variaciones detectadas en las regiones repetitivas de su genoma (RepMP1, RepMP2/3, RepMP4, RepMP5). Sin embargo, la alta frecuencia de eventos de recombinación homóloga que se presentan en el gen *P1*, pone en duda el poder de discriminación de las técnicas de tipificación basadas en este gen, pues existe la probabilidad de que no se estén detectando las variantes genotípicas de la bacteria (1,2,73). La PCR-RFLP, es la técnica que se ha empleado tradicionalmente en la tipificación del gen *P1*, tiene diferentes limitaciones en la caracterización de las cepas; la primera es la necesidad de aislar previamente las cepas en cultivo, lo que supone un tiempo de incubación prolongado y baja sensibilidad; y la segunda es que la técnica solo permite diferenciar las cepas de los pacientes en dos tipos (Tipo 1 y Tipo 2), lo que limita el conocimiento de la importancia epidemiológica que tienen las variantes genotípicas de *M. pneumoniae* (3,24).

Para suplir estos inconvenientes se han desarrollado otras técnicas de tipificación molecular a partir de los productos obtenidos por PCR que amplifican directamente

el DNA extraído de muestras respiratorias, lo que evita que se subestimen los genotipos debido a posibles diferencias en la eficiencia de propagación de los tipos y variantes en el cultivo (23,73,75). Recientemente Degrangé *et al.* desarrollaron un análisis del número variable de las repeticiones en tándem de múltiples locus (VNTR), en el cual se emplearon 5 locus del genoma de la bacteria (Mpn1, Mpn13, Mpn14, Mpn15, Mpn16), lo que permitió discriminar las cepas analizadas en 26 tipos VNTR diferentes de *M. pneumoniae* (76); a pesar de que la técnica demostró tener un mayor poder de discriminación (Índice de Diversidad de Hunter-Gastón [HGDI]: 0.915) que la tipificación rutinaria del gen *P1* (HGDI:0.511), tiene importantes limitaciones que vale la pena mencionar: i) su desarrollo es costoso, pues el análisis requiere equipos especializados que solo se encuentran disponibles en laboratorios de investigación; ii) uno de los locus empleados en el ensayo (Mpn1) no es estable, presentando variaciones no reproducibles que en algunos casos dificulta la interpretación del perfil alélico de las cepas, y por consiguiente la definición del Tipo MLVA al que pertenecen. Por esta razón algunos autores sugieren excluir este locus del análisis y generar un perfil alélico con la información obtenida de las repeticiones de los cuatro locus restantes (Mpn13, Mpn14, Mpn15, Mpn16), lo que finalmente generaría un Tipo MLVA de cuatro dígitos (77); iii) recientemente varios estudios han descrito la similitud que existe entre los resultados obtenidos cuando se realiza la tipificación de las cepas clínicas con MLVA y gen *P1*. Díaz *et al* determinaron que tres Tipos MLVA (4572, 3562 y 3662) representaron el 97% de los encontrados en las cepas recolectadas en las investigaciones de brotes, casos esporádicos y clústeres de infección por *M. pneumoniae* durante ocho años por los CDC; de manera llamativa, dos de estos tres Tipos (4572 y 3562) tenían una distribución muy similar a la que se encontró con la tipificación del gen *P1* [Tipo 1 (57%) versus Tipo 4572 (54%); Tipo 2(34%) versus Tipo 3562 (32%), y Variante del Tipo 2 (9%) versus Tipo 3662 (11%)] (33).

Dumke *et al* (75) por su parte comparó los resultados obtenidos de la tipificación del gen *P1* y el análisis MLVA. En sus resultados se observa como las cepas que pertenecen al Tipo 2 y las variantes V2a y V2b se agrupan en su gran mayoría en los Tipos MLVA B, G, M, S, Y, V y O de acuerdo con la nomenclatura propuesta por

Dregrangé *et al*; si se extrapola esta agrupación a la nomenclatura propuesta con la exclusión del locus Mpn1, las cepas se agrupan en los Tipos 3562 y 3662 MLVA. Al igual que Dumke, Waller *et al* (78), determinaron la similitud entre la distribución de dos Tipos de MLVA con los Tipos del gen *P1*, encontrados en las cepas aisladas durante un brote de infección respiratoria asociado con *M. pneumoniae*. Estas descripciones realizadas demuestran que los resultados obtenidos con ambos métodos de tipificación son similares.

A pesar de que en el presente estudio no se realizó la tipificación de las cepas con MLVA-VNTR, los resultados anteriormente descritos demuestran que con una probabilidad muy alta, las muestras de nuestro estudio que fueron clasificadas como Tipo1, pertenecerían al Tipo MLVA 4572 y aquellas muestras en las que se determinó la Variante V2a, pertenecen a los Tipos 3562 o 3662 de *M. pneumoniae*.

Pese a que el poder de discriminación de los ensayos MLVA pareciera ser mayor, hasta el momento no se ha determinado relación entre los Tipos MLVA con alguna característica clínica de las infecciones causadas por *M. pneumoniae*. En general no hay evidencia concreta que permita relacionar los genotipos o variantes de la bacteria con alguna característica de la enfermedad, por ejemplo, la sintomatología o la gravedad, ni tampoco con aspectos propios de las cepas, como la resistencia a macrólidos o su capacidad para generar brotes de infección respiratoria (33,61).

De acuerdo con lo anterior surgen dos hipótesis importantes, la primera es que las técnicas que se emplean actualmente para la tipificación de las cepas de *M. pneumoniae* no son lo suficientemente discriminatorias para determinar asociaciones entre los genotipos y el comportamiento epidemiológico de la enfermedad; la segunda hipótesis es que los cambios que se generan en la secuencia de nucleótidos que dan origen a las Tipos y variantes de *M. pneumoniae*, no son lo suficientemente significativos para reflejarse en la secuencia de aa de la proteína p1, por lo que estas mutaciones no generarían cambios considerables en la virulencia de las cepas.

Probablemente para resolver este asunto, se requiere una exploración más amplia de diversos tipos de genomas de la bacteria, por ejemplo, aquellos reportados de

cepas resistentes y sensibles, los aislados en brotes y los que se obtienen de rutina durante la atención de los pacientes, o los que se obtienen de pacientes con neumonías clínicamente complicadas. De igual forma, es necesario refinar las técnicas empleadas actualmente para la tipificación, pues la información obtenida con el gen *P1* solo permite conocer dos genotipos y pocas variantes de la bacteria; y con el análisis de las secuencias de múltiples locus (MLST) de genes constitutivos y estructurales, no se obtuvo un resultado exitoso en el análisis de cepas de *M. pneumoniae*, básicamente por la poca presencia de polimorfismos en estos genes (21,76). Igualmente, con un análisis mucho más discriminatorio como el MLVA-VNTR no se obtiene información adicional que permita evidenciar factores de la bacteria que contribuyen con la severidad de la neumonía (33,61).

A pesar de que en nuestros pacientes no se encontraron muestras con mutaciones asociadas con resistencia a macrólidos, se debe tener en cuenta que en los países donde se reportan altas frecuencias en la circulación de este tipo de cepas, se ha relacionado su circulación con el uso ampliado de macrólidos para el tratamiento de infecciones respiratorias causadas por *M. pneumoniae* (35,47,48,59). Debido a que los métodos actuales empleados en el diagnóstico de la neumonía causada por esta bacteria no permiten discriminar entre la portación asintomática y la infección, o una infección pasada de una reciente (38,45), es probable que se estén sobrestimando los diagnósticos de infección respiratoria y, como consecuencia, muchos pacientes estén recibiendo tratamiento antibiótico innecesario; este comportamiento no sería ajeno a nuestra realidad si consideramos que, en nuestro medio, en muchas de las instituciones en las que se hospitalizan los pacientes con NAC, se emplea la medición de anticuerpos IgM en fase aguda como única técnica de diagnóstico microbiológico.

Dos estudios recientes realizados en Italia e Israel demostraron la emergencia de resistencia a macrólidos en dos pacientes pediátricos durante el tratamiento con claritromicina y azitromicina, respectivamente. En los dos pacientes se encontró la mutación A2063G en los días 10 y 11 posterior al tratamiento y fue necesario modificar la terapia. El resultado de la tipificación, con el gen *P1*, estuvo disponible

para el paciente de origen Italiano y se determinó la Variante V2a de *M. pneumoniae* (primer reporte de resistencia a macrólidos en este genotipo) (55,79). Estos resultados generan dos hipótesis sobre este fenómeno particular, la primera es que los pacientes pudieran tener una población de cepas mixtas (sensibles y resistentes) y en los días previos a la detección de la mutación, la técnica de tipificación solo identificó aquellas cepas que no poseen la mutación; la segunda hipótesis se inclina por definir que las mutaciones en las cepas se generan *de novo*; sin embargo, se requieren estudios posteriores para definir con más detalle este aspecto.

De otro lado, en uno de nuestros pacientes se determinó discordancia entre el genotipo identificado en la muestra de esputo inducido con el detectado en HNF; debido a que este fenómeno solo fue determinado en un paciente, no podemos inferir conclusiones adicionales sobre este resultado, se requieren estudios posteriores para determinar la importancia de este comportamiento, por ejemplo si alguno de los genotipos de la bacteria es más propenso a colonizar el tracto respiratorio. Sin embargo, es importante mencionar que nuestros resultados, al igual los obtenidos en un estudio realizado recientemente en nuestro grupo, evidenciaron la superioridad de la muestra de esputo inducido frente al rendimiento encontrado en HNF para la detección de *M. pneumoniae*, mediante técnicas moleculares. La sensibilidad de las PCR empleadas para la detección de la bacteria (una estandarizada en el estudio y dos comerciales) en muestras de esputo oscilo entre 52-57%, mientras que para las muestras de HNF y aspirados nasofaríngeos (ANF) solo alcanzó el 23% (80).

De manera similar a las variaciones descritas en el rendimiento de las muestras, existen variaciones en el rendimiento de los protocolos de PCR empleados en el diagnóstico de *M. pneumoniae*. En la literatura se describen numerosos protocolos de PCR en los que se amplifican diferentes genes de la bacteria; sin embargo, los resultados de la sensibilidad y especificidad de estas pruebas son muy variables (desde 9 a 100%) (81,82) y la concordancia con los métodos de referencia aceptados (cultivo y serología pareada) en algunos reportes es muy baja (80). Incluso si comparamos la proporción de resultados positivos en muestras de esputo

entre las tres PCRs descritas en el presente estudio, se encuentra una alta variabilidad (PCR del gen *23S rRNA* 49.3%, PCR del gen *P1* 71.2%, y PCR Seeplex®*Pneumobacter* 74%). Algunos factores que pueden conducir a estas diferencias son el blanco molecular empleado (genes de una copia o múltiples, diferentes regiones del gen), el tipo de muestra (esputo, HNF, ANF), la población en la que se validan los resultados, o el diseño de los protocolos de PCR (pruebas monoplex, dúplex o múltiple, PCR convencionales o en tiempo real).

Si se tienen en cuenta las limitaciones de la serología pareada y los aspectos previamente mencionados con relación a las técnicas de PCR, es imperativo diseñar mejores técnicas para el diagnóstico de la NAC causada por *M. pneumoniae*, partiendo desde la detección de posibles blancos moleculares y selección de diferentes grupos de pacientes en los que se pueda determinar la validez de las pruebas.

Por último, los resultados de la localización en el mapa de Medellín de las zonas de riesgo de los casos de NAC en los que se detectó *M. pneumoniae* (Anexo 3), es similar a la distribución de los casos de NAC que previamente fueron caracterizados en un estudio reciente realizado por nuestro grupo (83). Incluso, si se compara esta distribución con la que se obtiene en el análisis de los casos de tuberculosis referenciados en un estudio previo (84), no se observan diferencias en las zonas donde se localizan los casos (Anexo 5). Este comportamiento de los resultados sugiere que probablemente en estas dos zonas de la ciudad existen factores especiales (sociales, geográficos, de salud) que favorecen la diseminación de estos patógenos respiratorios, y por tanto, se pudiera considerar que estos son sitios críticos en la ciudad hacia donde es necesario dirigir acciones de salud pública para controlar y prevenir la aparición de más casos de neumonía.

La principal limitación del estudio es que no se dispuso de cultivo para la identificación confiable de las cepas, establecer las MICs de los aislamientos y su correlación con el perfil de sensibilidad genotípica; esto básicamente por la carencia de infraestructura y personal entrenado en nuestro laboratorio y la ausencia en el

mercado de dicha prueba. De otro lado, el periodo de captación de niños fue de un año y esto puede explicar la detección de un solo genotipo. Para identificar cambios en la circulación de los genotipos se requieren estudios con períodos de por lo menos cinco años, con el fin de establecer tendencias en el tiempo y la ocurrencia del patrón cíclico asociado con las infecciones causadas por *M. pneumoniae*.

Para concluir, podemos definir que las cepas de *M. pneumoniae* que causan NAC en los niños de Medellín y municipios cercanos, pertenecen a la variante V2a. Por otra parte una pequeña proporción de pacientes tienen muestras en las que se identifica el Tipo 1 de *M. pneumoniae*, lo que podría suponer el inicio en la circulación de un nuevo tipo de la bacteria. Actualmente en nuestro medio no circulan cepas con mutaciones asociadas con resistencia, y por tanto el tratamiento con macrólidos sigue siendo una opción válida en aquellos pacientes en los que el clínico decide realizar manejo antimicrobiano.

El aporte de nuestro estudio al conocimiento de la biología de la bacteria y la epidemiología de la NAC causada por esta, enriquecido con la implementación de un adecuado programa de vigilancia de las infecciones respiratorias causadas por *M. pneumoniae* (con el que se realice un monitoreo continuo de las cepas que circulan a nivel regional o nacionalmente) pudiera generar información oportuna y expedita que permita establecer de manera asertiva: i) el verdadero impacto que tienen las neumonías causadas por *M. pneumoniae* localmente y en el país; ii) los cambios en la circulación de los genotipos de la bacteria, incluyendo la caracterización de variantes de *M. pneumoniae* que se han descrito recientemente (Variante V2c y V2d, 3896 que hasta el momento solo se han detectado en aislamientos a partir de cultivo); iii) la detección temprana de brotes de infección respiratoria asociados con *M. pneumoniae*; y iv) el diseño de estrategias de contención que disminuyan la propagación de los casos.

Todo lo anterior debería estar reforzado por el diseño e implementación de pruebas de diagnóstico microbiológico sensibles y específicas, que permitan establecer de manera confiable el diagnóstico de las infecciones y la definición de un método de tipificación común en diversos laboratorios (clínicos, de referencia e investigación)

de la ciudad, el país o el mundo, con el que se genere información similar que sea comparable entre regiones y que permita finalmente establecer cadenas de transmisión, revelar clonalidad y generar una red de información de datos, similar a la que se ha establecido con otras bacterias patógenas para los humanos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Waites KB, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. Clin Microbiol Rev. 2004 Oct;17(4):697–728, table of contents.
2. Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of *mycoplasmas*. Microbiol Mol Biol Rev MMBR. 1998 Dec;62(4):1094–156.
3. Cousin-Allery A, Charron A, de Barbeyrac B, Fremy G, Skov Jensen J, Renaudin H, et al. Molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* strains by PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. Application to French and Danish isolates. Epidemiol Infect. 2000 Feb;124(1):103–11.
4. Cunha BA. The atypical pneumonias: clinical diagnosis and importance. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. 2006 May;12 Suppl 3:12–24.
5. Razin S, Jacobs E. Mycoplasma adhesion. J Gen Microbiol. 1992 Mar 1;138(3):407–22.
6. Willby MJ, Krause DC. Characterization of a *Mycoplasma pneumoniae* hmw3 Mutant: Implications for Attachment Organelle Assembly. J Bacteriol. 2002 Jun 1;184(11):3061–8.
7. Layh-Schmitt G, Podtelejnikov A, Mann M. Proteins complexed to the P1 adhesin of *Mycoplasma pneumoniae*. Microbiology. 2000 Mar 1;146(3):741–7.
8. Jacobs E. *Mycoplasma pneumoniae*: now in the focus of clinicians and epidemiologists. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull. 2012;17(6).
9. Waites KB, Balish MF, Atkinson TP. New insights into the pathogenesis and detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. Future Microbiol. 2008 Dec;3(6):635–48.
10. Vélez Lázaro, Aguilar Yudy, Rueda Zulma, Arroyave Marta, Segura Angela. Is Etiology of Community Acquired Pneumonia (CAP) Changing in Latin America (LA)? High Prevalence of Atypical Bacteria (AtB) and Respiratory Viruses (RV) in Medellín, Colombia. 2007. 411.
11. Vera C, Copete A, Rueda Z, Aguilar Y, Vélez L. Memorias IX encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas. Infectio. 2014 Agosto;18(S1):57.
12. Mejía S, Rueda Z, López L, Vélez L. Memorias VIII Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas. Infectio. 2012 May;16:25.

13. Luna CM, Famiglietti A, Absi R, Videla AJ, Nogueira FJ, Fuenzalida AD, et al. Community-acquired pneumonia: etiology, epidemiology, and outcome at a teaching hospital in Argentina. *Chest*. 2000 Nov;118(5):1344–54.
14. Jardim JR, Rico G, de la Roza C, Obispo E, Urueta J, Wolff M, et al. [A comparison of moxifloxacin and amoxicillin in the treatment of community-acquired pneumonia in Latin America: results of a multicenter clinical trial]. *Arch Bronconeumol*. 2003 Sep;39(9):387–93.
15. Von Baum H, Welte T, Marre R, Suttorp N, Lück C, Ewig S. *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia revisited within the German Competence Network for Community-acquired pneumonia (CAPNETZ). *BMC Infect Dis*. 2009;9:62.
16. Mondaca P R, Pizarro C V, Cares V, Eymin G. [Hemolysis, serositis and exanthema induced by *Mycoplasma pneumoniae* infection. Report of one case]. *Rev Médica Chile*. 2014 Oct;142(10):1334–7.
17. Yimenicioğlu S, Yakut A, Ekici A, Bora Carman K, Cagrı Dinleyici E. *Mycoplasma pneumoniae* infection with neurologic complications. *Iran J Pediatr*. 2014 Oct;24(5):647–51.
19. Nilsson AC, Björkman P, Welinder-Olsson C, Widell A, Persson K. Clinical severity of *Mycoplasma pneumoniae* (MP) infection is associated with bacterial load in oropharyngeal secretions but not with MP genotype. *BMC Infect Dis*. 2010;10:39.
20. Walter ND, Grant GB, Bandy U, Alexander NE, Winchell JM, Jordan HT, et al. Community outbreak of *Mycoplasma pneumoniae* infection: school-based cluster of neurologic disease associated with household transmission of respiratory illness. *J Infect Dis*. 2008 Nov 1;198(9):1365–74.
21. Dumke R, Catrein I, Pirkil E, Herrmann R, Jacobs E. Subtyping of *Mycoplasma pneumoniae* isolates based on extended genome sequencing and on expression profiles. *Int J Med Microbiol IJMM*. 2003 Feb;292(7-8):513–25.
22. Dallo SF, Horton JR, Su CJ, Baseman JB. Restriction fragment length polymorphism in the cytoadhesin P1 gene of human clinical isolates of *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect Immun*. 1990 Jun;58(6):2017–20.
23. Dumke R, Lück PC, Noppen C, Schaefer C, von Baum H, Marre R, et al. Culture-independent molecular subtyping of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples. *J Clin Microbiol*. 2006 Jul;44(7):2567–70.
24. Dorigo-Zetsma JW, Dankert J, Zaat SA. Genotyping of *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates reveals eight P1 subtypes within two genomic groups. *J Clin Microbiol*. 2000 Mar;38(3):965–70.

25. Zhao F, Cao B, Li J, Song S, Tao X, Yin Y, et al. Sequence analysis of the p1 adhesin gene of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical isolates collected in Beijing in 2008 to 2009. *J Clin Microbiol*. 2011 Aug;49(8):3000–3.
26. Kenri T, Taniguchi R, Sasaki Y, Okazaki N, Narita M, Izumikawa K, et al. Identification of a new variable sequence in the P1 cytoadhesin gene of *Mycoplasma pneumoniae*: evidence for the generation of antigenic variation by DNA recombination between repetitive sequences. *Infect Immun*. 1999 Sep;67(9):4557–62.
27. Dorigo-Zetsma JW, Wilbrink B, Dankert J, Zaat SA. *Mycoplasma pneumoniae* P1 type 1- and type 2-specific sequences within the P1 cytoadhesin gene of individual strains. *Infect Immun*. 2001 Sep;69(9):5612–8.
28. Pereyre S, Charron A, Renaudin H, Bébéar C, Bébéar CM. First report of macrolide-resistant strains and description of a novel nucleotide sequence variation in the P1 adhesin gene in *Mycoplasma pneumoniae* clinical strains isolated in France over 12 years. *J Clin Microbiol*. 2007 Nov;45(11):3534–9.
29. Spuesens EBM, Oduber M, Hoogenboezem T, Sluijter M, Hartwig NG, van Rossum AMC, et al. Sequence variations in RepMP2/3 and RepMP4 elements reveal intragenomic homologous DNA recombination events in *Mycoplasma pneumoniae*. *Microbiol Read Engl*. 2009 Jul;155(Pt 7):2182–96.
30. Xiao J, Liu Y, Wang M, Jiang C, You X, Zhu C. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* P1 subtype variations by denaturing gradient gel electrophoresis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014 Jan;78(1):24–8.
31. Chaudhry R, Nisar N, Hora B, Chirasani SR, Malhotra P. Expression and immunological characterization of the carboxy-terminal region of the P1 adhesin protein of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 2005 Jan;43(1):321–5.
32. Eun BW, Kim NH, Choi EH, Lee HJ. *Mycoplasma pneumoniae* in Korean children: the epidemiology of pneumonia over an 18-year period. *J Infect*. 2008 May;56(5):326–31.
33. Diaz MH, Benitez AJ, Winchell JM. Investigations of *Mycoplasma pneumoniae* infections in the United States: trends in molecular typing and macrolide resistance from 2006 to 2013. *J Clin Microbiol*. 2015 Jan;53(1):124–30.
34. 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 Syst Rev*. 2012;10:CD009175.
35. Kawai Y, Miyashita N, Kubo M, Akaike H, Kato A, Nishizawa Y, et al. Nationwide surveillance of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* infection in pediatric patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Aug;57(8):4046–9.

36. Martínez MA, Ruiz M, Zunino E, Luchsinger V, Aguirre R, Avendaño LF. Identification of P1 types and variants of *Mycoplasma pneumoniae* during an epidemic in Chile. *J Med Microbiol*. 2010 Aug;59(Pt 8):925–9.
37. Pérez I, Gómez M, González Rico S. El diagnóstico convencional de *Mycoplasma pneumoniae* como agente causal de Neumonías Adquiridas en la Comunidad (NAC). *Rev Soc Venez Microbiol*. 2007 Jan;27(2):73–8.
38. Talkington DF, Shott S, Fallon MT, Schwartz SB, Thacker WL. Analysis of Eight Commercial Enzyme Immunoassay Tests for Detection of Antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* in Human Serum. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004 Sep;11(5):862–7.
39. Blanco S, Fuenzalida L, Bas A, Prat C, Ramírez A, Matas L, et al. Comparison of 2 molecular assays and a serologic test in diagnosing *Mycoplasma pneumoniae* infection in paediatrics patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011 Dec;71(4):463–6.
40. Loens K, Van Heirstraeten L, Malhotra-Kumar S, Goossens H, Ieven M. Optimal sampling sites and methods for detection of pathogens possibly causing community-acquired lower respiratory tract infections. *J Clin Microbiol*. 2009 Jan;47(1):21–31.
41. Chaudhry R, Sharma S, Javed S, Passi K, Dey AB, Malhotra P. Molecular detection of *Mycoplasma pneumoniae* by quantitative real-time PCR in patients with community acquired pneumonia. *Indian J Med Res*. 2013;138:244–51.
42. Otomo S, Yamamura J-I, Hayashi E, Nakamura T, Kakinuma H, Nakamoto Y, et al. Analysis of children with Chlamydia (Chlamydia) pneumoniae and *Mycoplasma pneumoniae* respiratory infections by real-time PCR assay and serological tests. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. 2008 Jun;116(6):477–83.
43. Wang Y, Kong F, Yang Y, Gilbert GL. A multiplex PCR-based reverse line blot hybridization (mPCR/RLB) assay for detection of bacterial respiratory pathogens in children with pneumonia. *Pediatr Pulmonol*. 2008 Feb;43(2):150–9.
44. Winchell JM, Thurman KA, Mitchell SL, Thacker WL, Fields BS. Evaluation of three real-time PCR assays for detection of *Mycoplasma pneumoniae* in an outbreak investigation. *J Clin Microbiol*. 2008 Sep;46(9):3116–8.
45. Spuesens EBM, Fraaij PLA, Visser EG, Hoogenboezem T, Hop WCJ, van Adrichem LNA, 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.

46. Wood PR, Hill VL, Burks ML, Peters JI, Singh H, Kannan TR, et al. *Mycoplasma pneumoniae* in children with acute and refractory asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol Off Publ Am Coll Allergy Asthma Immunol*. 2013 May;110(5):328–334.e1.
47. Saraya T, Kurai D, Nakagaki K, Sasaki Y, Niwa S, Tsukagoshi H, et al. Novel aspects on the pathogenesis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia and therapeutic implications. *Front Microbiol*. 2014;5:410.
48. Bébéar C, Pereyre S, Peuchant O. *Mycoplasma pneumoniae*: susceptibility and resistance to antibiotics. *Future Microbiol*. 2011 Apr;6(4):423–31.
49. Morozumi M, Takahashi T, Ubukata K. Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*: characteristics of isolates and clinical aspects of community-acquired pneumonia. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother*. 2010 Apr;16(2):78–86.
50. Principi N, Esposito S. Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*: its role in respiratory infection. *J Antimicrob Chemother*. 2013 Mar;68(3):506–11.
51. Komatsu H, Tsunoda T, Inui A, Sogo T, Fujisawa T. Characteristics of hospitalized children infected with macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*. *Braz J Infect Dis Off Publ Braz Soc Infect Dis*. 2014 Jun;18(3):294–9.
52. Cheong K-N, Chiu SS, Chan BW-K, To KK-W, Chan EL-Y, Ho P-L. Severe macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia associated with macrolide failure. *J Microbiol Immunol Infect Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*. 2014 Nov 11;
53. Meyer Sauter PM, van Rossum AMC, Vink C. *Mycoplasma pneumoniae* in children: carriage, pathogenesis, and antibiotic resistance. *Curr Opin Infect Dis*. 2014 Jun;27(3):220–7.
54. Okazaki N, Narita M, Yamada S, Izumikawa K, Umetsu M, Kenri T, et al. Characteristics of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated from patients and induced with erythromycin in vitro. *Microbiol Immunol*. 2001;45(8):617–20.
55. Averbuch D, Hidalgo-Grass C, Moses AE, Engelhard D, Nir-Paz R. Macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae*, Israel, 2010. *Emerg Infect Dis*. 2011 Jun;17(6):1079–82.
56. Chironna M, Sallustio A, Esposito S, Perulli M, Chinellato I, Di Bari C, et al. Emergence of macrolide-resistant strains during an outbreak of *Mycoplasma pneumoniae* infections in children. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Apr;66(4):734–7.

57. Eshaghi A, Memari N, Tang P, Olsha R, Farrell DJ, Low DE, et al. Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in humans, Ontario, Canada, 2010-2011. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(9).
58. Cao B, Zhao C-J, Yin Y-D, Zhao F, Song S-F, Bai L, et al. High prevalence of macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* isolates from adult and adolescent patients with respiratory tract infection in China. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2010 Jul 15;51(2):189–94.
59. Zhao F, Liu G, Wu J, Cao B, Tao X, He L, et al. Surveillance of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in Beijing, China, from 2008 to 2012. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Mar;57(3):1521–3.
60. Spuesens EBM, Meijer A, Bierschenk D, Hoogenboezem T, Donker GA, Hartwig NG, et al. Macrolide resistance determination and molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory specimens collected between 1997 and 2008 in The Netherlands. *J Clin Microbiol*. 2012 Jun;50(6):1999–2004.
61. Pereyre S, Charron A, Hidalgo-Grass C, Touati A, Moses AE, Nir-Paz R, et al. The spread of *Mycoplasma pneumoniae* is polyclonal in both an endemic setting in France and in an epidemic setting in Israel. *PloS One*. 2012;7(6):e38585.
62. Dumke R, Lück C, Jacobs E. Low rate of macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* strains in Germany between 2009 and 2012. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jul;57(7):3460.
63. Yamada M, Buller R, Bledsoe S, Storch GA. Rising rates of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in the central United States. *Pediatr Infect Dis J*. 2012 Apr;31(4):409–400.
64. Yoo S, Kim H-B, Choi S-H, Lee S-O, Kim S-H, Hong S-B, et al. Differences in the frequency of 23S rRNA gene mutations in *Mycoplasma pneumoniae* between children and adults with community-acquired pneumonia: clinical impact of mutations conferring macrolide resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Dec;56(12):6393–6.
65. Liu X, Jiang Y, Chen X, Li J, Shi D, Xin D. Drug resistance mechanisms of *Mycoplasma pneumoniae* to macrolide antibiotics. *BioMed Res Int*. 2014;2014:320801.
66. Suzuki S, Yamazaki T, Narita M, Okazaki N, Suzuki I, Andoh T, et al. Clinical evaluation of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Feb;50(2):709–12.
67. Matsubara K, Morozumi M, Okada T, Matsushima T, Komiyama O, Shoji M, et al. A comparative clinical study of macrolide-sensitive and macrolide-resistant

Mycoplasma pneumoniae infections in pediatric patients. J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother. 2009 Dec;15(6):380–3.

68. Morozumi M, Iwata S, Hasegawa K, Chiba N, Takayanagi R, Matsubara K, et al. Increased macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* in pediatric patients with community-acquired pneumonia. Antimicrob Agents Chemother. 2008 Jan;52(1):348–50.
69. Okada T, Morozumi M, Tajima T, Hasegawa M, Sakata H, Ohnari S, et al. Rapid effectiveness of minocycline or doxycycline against macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* infection in a 2011 outbreak among Japanese children. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2012 Dec;55(12):1642–9.
70. Zhou Y, Zhang Y, Sheng Y, Zhang L, Shen Z, Chen Z. More complications occur in macrolide-resistant than in macrolide-sensitive *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(2):1034–8.
71. Grundmann H, Aanensen DM, van den Wijngaard CC, Spratt BG, Harmsen D, Friedrich AW, et al. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. PLoS Med. 2010 Jan;7(1):e1000215.
72. Grundmann H, Klugman KP, Walsh T, Ramon-Pardo P, Sigauque B, Khan W, et al. A framework for global surveillance of antibiotic resistance. Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother. 2011 Apr;14(2):79–87.
73. Dumke R, Von Baum H, Lück PC, Jacobs E. Subtypes and variants of *Mycoplasma pneumoniae*: local and temporal changes in Germany 2003-2006 and absence of a correlation between the genotype in the respiratory tract and the occurrence of genotype-specific antibodies in the sera of infected patients. Epidemiol Infect. 2010 Dec;138(12):1829–37.
74. SLIPE. Consenso de la Sociedad Latinoamericana de Infectología Pediátrica (SLIPE) sobre Neumonía Adquirida en la Comunidad (NAC). 2010 Nov;XXIV(94):1–24.
75. Dumke R, Jacobs E. Culture-independent multi-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) of *Mycoplasma pneumoniae*. J Microbiol Methods. 2011 Sep;86(3):393–6.
76. Dégrange S, Cazanave C, Charron A, Renaudin H, Bébéar C, Bébéar CM. Development of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae*. J Clin Microbiol. 2009 Apr;47(4):914–23.
77. Sun H, Xue G, Yan C, Li S, Cao L, Yuan Y, et al. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis of *Mycoplasma pneumoniae* clinical specimens and proposal for amendment of MLVA nomenclature. PloS One. 2013;8(5):e64607.

78. Waller JL, Diaz MH, Petrone BL, Benitez AJ, Wolff BJ, Edison L, et al. Detection and characterization of *Mycoplasma pneumoniae* during an outbreak of respiratory illness at a university. *J Clin Microbiol.* 2014 Mar;52(3):849–53.
79. Cardinale F, Chironna M, Dumke R, Binetti A, Daleno C, Sallustio A, et al. Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in paediatric pneumonia. *Eur Respir J.* 2011 Jun 1;37(6):1522–4.
80. Herrera M. Estandarización y validación de una PCR múltiple (mPCR) para el diagnóstico de *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae* y *Legionella pneumophila* en pacientes con Neumonía Adquirida en la Comunidad (NAC) que requieren hospitalización, 2010-2012 [Tesis de Maestría]. [Facultad de Medicina]: Universidad de Antioquia; 2014.
81. 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 May 1;48(9):1244–9.
82. Ratliff AE, Duffy LB, Waites KB. Comparison of the illumigene Mycoplasma DNA Amplification Assay and Culture for Detection of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 2014 Apr 1;52(4):1060–3.
83. Bastidas D, López L, Rueda Z, Vélez L. Distribución espacial de *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, Virus Sincital Respiratorio, Parainfluenza virus y Rhonovirus en niños con neumonía adquirida en la comunidad del área urbana de Medellín 2011-2012. *Infectio.* 2014 Agosto;18(S1).
84. Molina A. Distribución geográfica de la Incidencia de tuberculosis y algunos factores relacionados, Medellín 2008-2010 [Tesis de Maestría]. [Facultad de Salud Pública]: Universidad de Antioquia; 2012.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Variantes de *M. pneumoniae* descritas por diferentes autores en el mundo.

Tabla 2: Sitios específicos de las mutaciones puntuales que se presentan en el dominio V del gen 23S rRNA de *M. pneumoniae*.

Tabla 3: Cebadores utilizados en la amplificación y caracterización descrita por Dumke *et al.*

Tabla 4: Características clínicas y sociodemográficas de los niños con NAC positivos para *M. pneumoniae* incluidos en el estudio.

Tabla 5: Información de localización y lugar de hospitalización de los niños en los que se detectó el Tipo 1 de *M. pneumoniae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: DNA de esputo amplificado con PCR del gen *P1*.

Figura 2: DNA de HNF amplificado con PCR del gen *P1*.

Figura 3: Distribución de los pacientes positivos por PCR del gen *P1* y 23S rRNA

Figura 4: DNA de esputo amplificado con PCR del gen 23S rRNA.

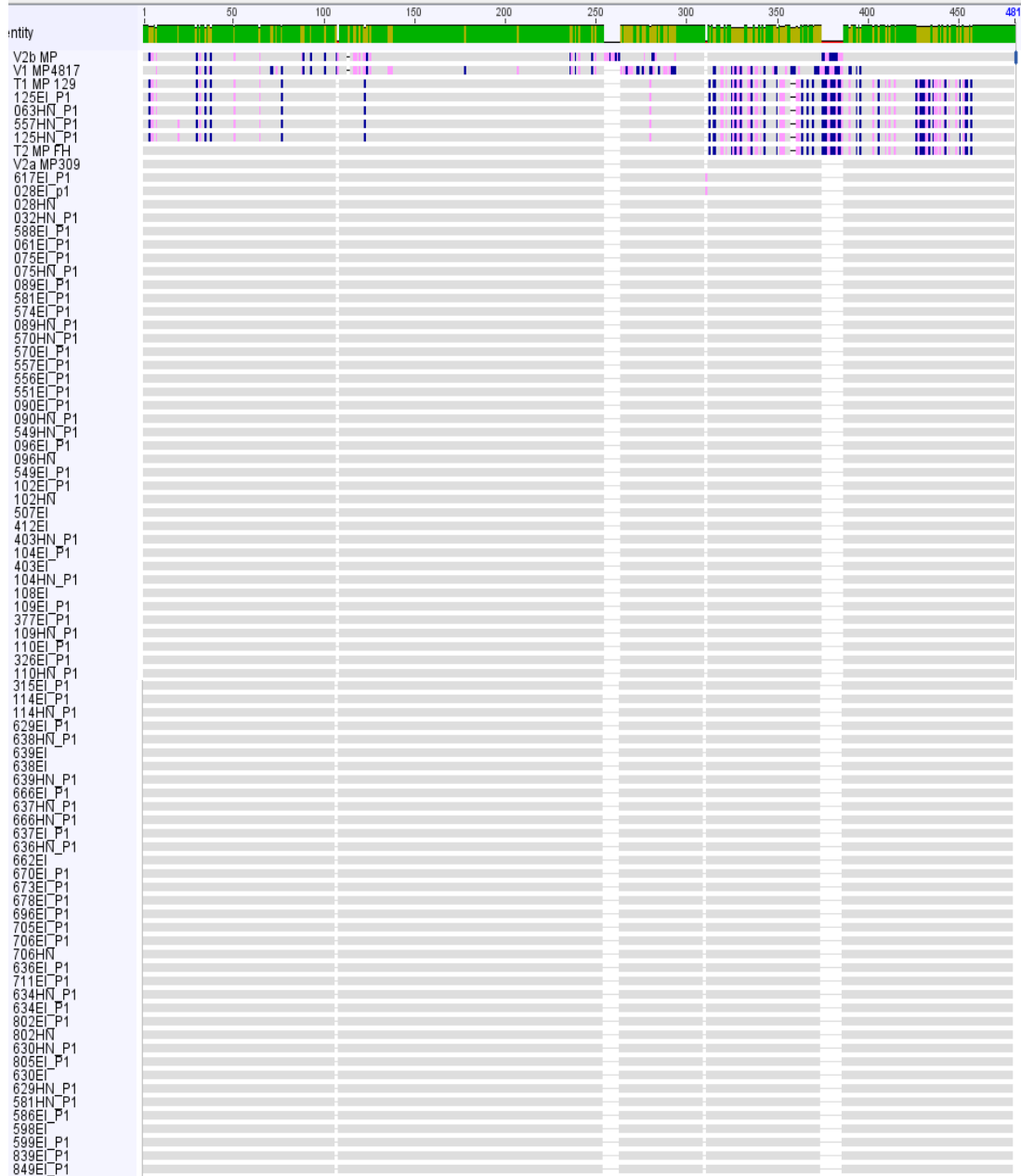
Figura 5: PCR de Control de inhibición.

Figura 6: Reproducibilidad intra-ensayo de la PCR del gen *P1*.

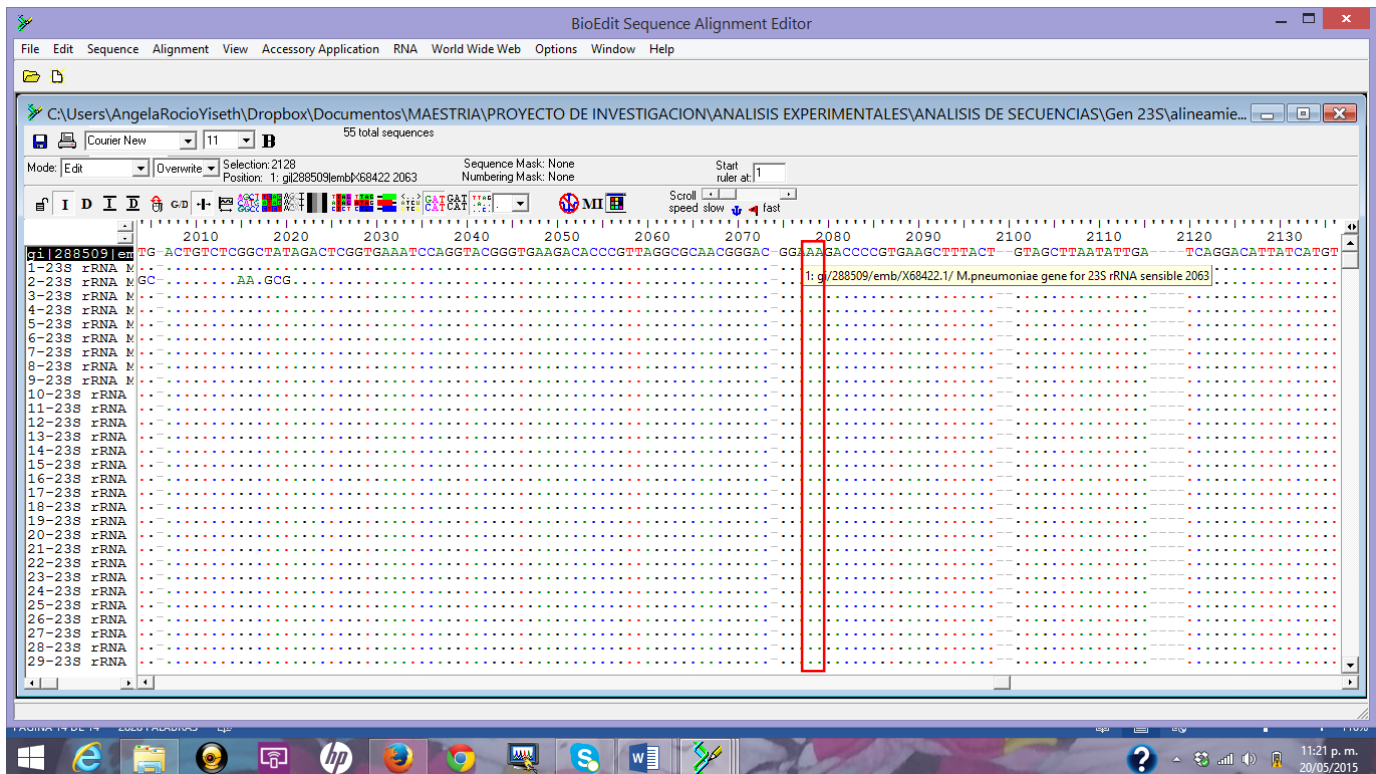
Figura 7: Reproducibilidad intra-ensayo de la PCR del gen 23S rRNA.

ANEXOS

Anexo 1. Alineamiento múltiple de las secuencias de DNA del gen *P1* obtenidas al analizar las muestras de esputo inducido e HNF.



Anexo 2. Alineamiento múltiple de las secuencias de DNA del gen 23S rRNA obtenidas al analizar las muestras de esputo inducido e HNF (Las posiciones incluidas en las barras rojas indican los nucleótidos donde se describen las mutaciones asociadas con resistencia, en este caso no se observaron dichas mutaciones)



BioEdit Sequence Alignment Editor

File Edit Sequence Alignment View Accessory Application RNA World Wide Web Options Window Help

C:\Users\AngelaRocioYiseth\Dropbox\Documentos\MAESTRIA\PROYECTO DE INVESTIGACION\ANALISIS EXPERIMENTALES\ANALISIS DE SECUENCIAS\Gen 23S\alineamie... 55 total sequences

Mode: Edit Overwrite Selection: 2128 Position: 2082 Sequence Mask: None Numbering Mask: None Start ruler at: 1

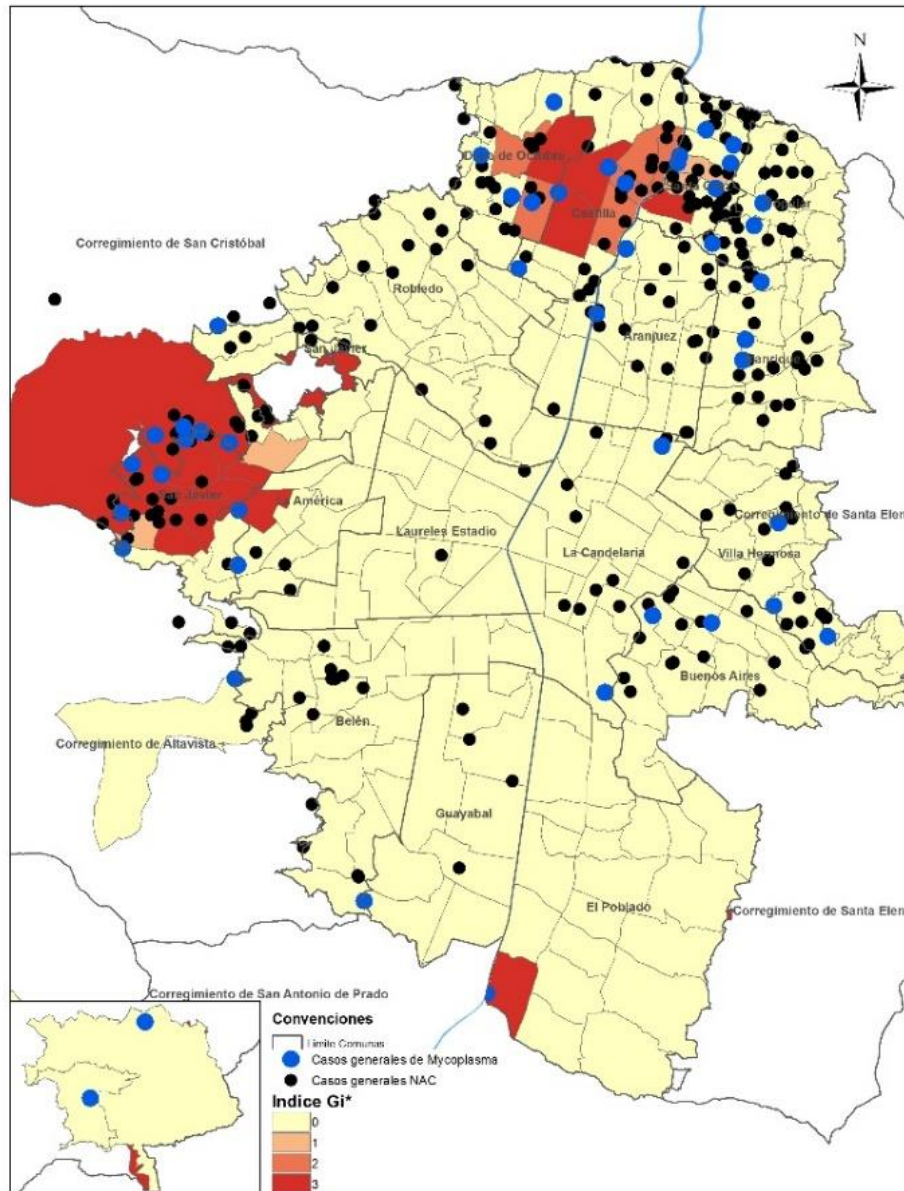
Scroll speed slow fast

2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100 2110 2120 2130

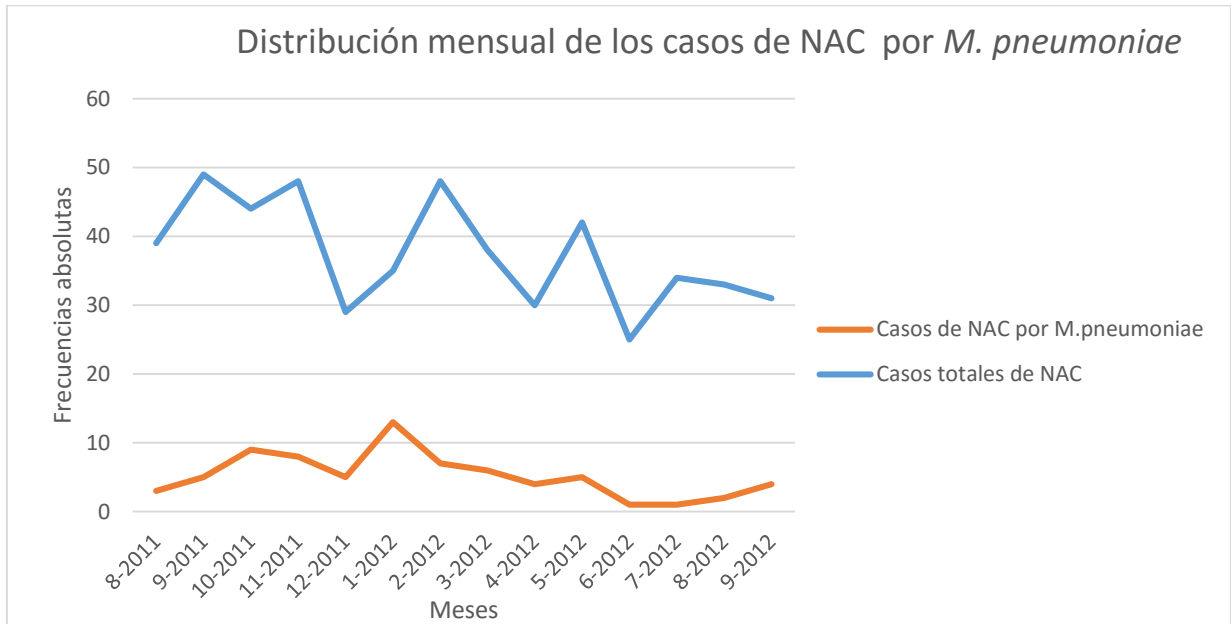
25-23S rRNA
26-23S rRNA
27-23S rRNA
28-23S rRNA
29-23S rRNA
30-23S rRNA
31-23S rRNA
32-23S rRNA
33-23S rRNA
34-23S rRNA
35-23S rRNA
36-23S rRNA
37-23S rRNA
39-23S rRNA
40-23S rRNA
41-23S rRNA
42-23S rRNA
43-23S rRNA
44-23S rRNA
45-23S rRNA
46-23S rRNA
47-23S rRNA
48-23S rRNA
49-23S rRNA
49-23S rRNA
50-23S rRNA
51-23S rRNA
52-23S rRNA
54-23S rRNA
55-23S rRNA

The screenshot displays the BioEdit Sequence Alignment Editor interface. The main window shows a multiple sequence alignment of 23S rRNA sequences from various strains, labeled as 25-23S rRNA through 55-23S rRNA. The alignment is visualized as a grid of colored dots representing nucleotide matches and mismatches. A red vertical box highlights a specific region of the alignment, centered around position 2080. The top of the window features a menu bar with options like File, Edit, Sequence, Alignment, View, Accessory Application, RNA, World Wide Web, Options, Window, and Help. Below the menu bar is a toolbar with various icons for editing and viewing. The status bar at the bottom indicates the current mode (Edit), selection (2128), position (2082), and sequence mask (None). The Windows taskbar is visible at the bottom of the screen, showing the system tray with the date and time (11:22 p. m., 20/05/2015).

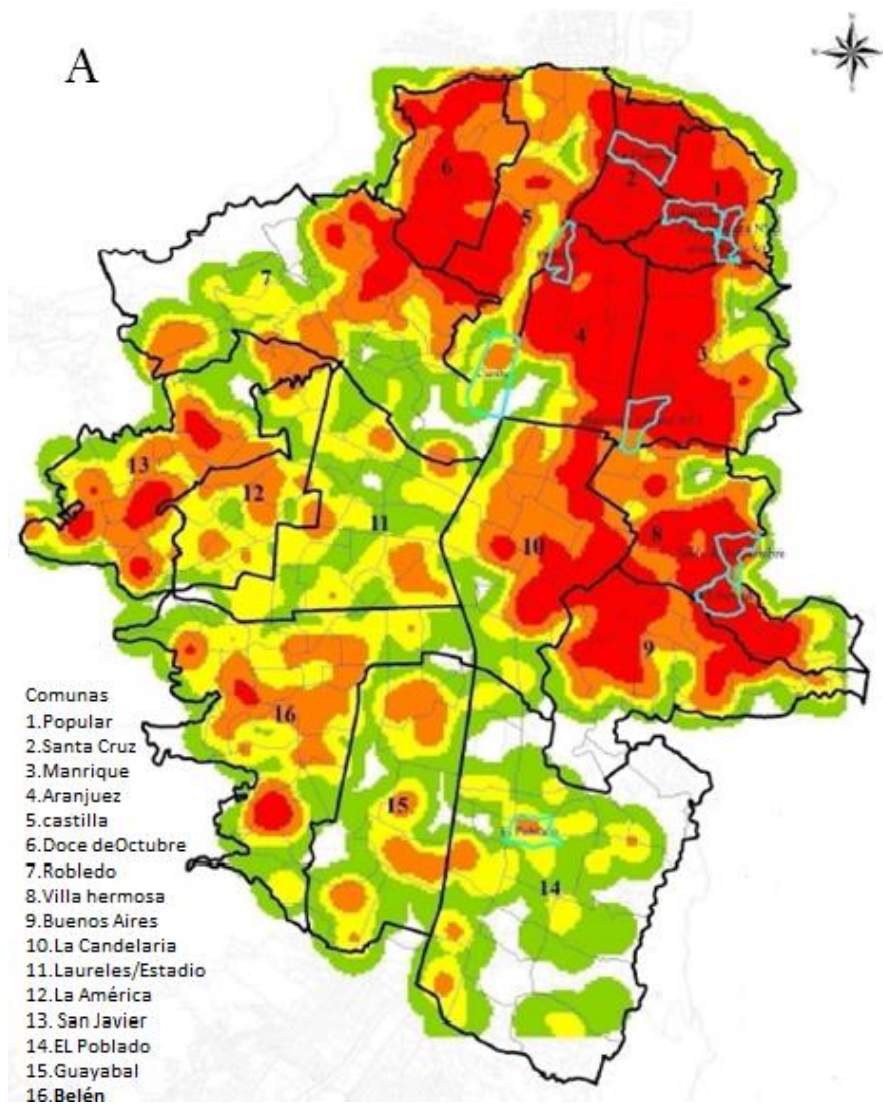
Anexo 3. Representación en el mapa de Medellín de la distribución espacial de los 48 casos de NAC asociados con *M. pneumoniae*.



Anexo 4. Distribución mensual de los casos de NAC asociados con *M. pneumoniae*.



Anexo 5. Representación en el mapa de Medellín de la incidencia de casos de tuberculosis reportados en un estudio previo.



Fuente del mapa a: Molina-Giraldo Adriana María. Distribución geográfica de la incidencia de tuberculosis y algunos factores relacionados, Medellín 2008-2010. Master's Thesis. Universidad de Antioquia, Facultad Nacional de Salud Pública; 2012.