

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR), PARA EL DIAGNÓSTICO DE MYCOPLASMA PNEUMONIAE Y CHLAMYDIA PNEUMONIAE EN SANGRE.

POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR), FOR THE DIAGNOSIS OF MYCOPLASMA PNEUMONIAE AND CHLAMYDIA PNEUMONIAE IN BLOOD.

Autores: Yelitza Campos^{1,2,3*}, Lester Thula¹, Mayra Cuervo¹, Cesar Serrano³, Yesenia Quintero¹, Luis Luis³, Tamara Ocando¹.
Correo: yelcampos@gmail.com

¹ Laboratorio Clínico Centro Médico Paso Real. ² Laboratorio de Fisiopatología, Instituto de Biomedicina, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. ³ DIAGEN, C.A. Venezuela.

Fecha de recibido: 1Dic17

Fecha de aceptado: 15Jun18

Fecha de publicación: 10Jun19

Resumen

Mycoplasma pneumoniae y *Chlamydia pneumoniae* son bacterias causantes de neumonías atípicas. En Venezuela, las tasas de infección de estos agentes no se conocen por falta de confirmación diagnóstica, debido en parte, al difícil cultivo de estos microorganismos. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede ser una alternativa para un diagnóstico sensible, específico y rápido de los mismos. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la PCR como herramienta para el diagnóstico de infecciones por *M. pneumoniae* y *C. pneumoniae* a partir de sangre total. Para ello, se evaluaron muestras de sangre total/EDTA de 106 pacientes con cuadro clínico de enfermedad respiratoria atendidos en el Centro Médico Paso Real, Estado Miranda. Se aisló el ADN y se realizó la PCR. Los resultados indican que 13.2 % de los pacientes resultaron positivos para *Mycoplasma pneumoniae* y 11.3 % resultaron positivos para *Chlamydia pneumoniae*, observándose una mayor frecuencia en el grupo de niños menores de 10 años. En conclusión, la PCR en sangre periférica nos permitió hacer un diagnóstico específico de estos microorganismos, lo cual sugiere que esta técnica puede ser una alternativa que permita un diagnóstico diferencial y oportuno para estas patologías.

Palabras Clave: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), Neumonías Atípicas, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, Diagnóstico Molecular.

Abstract

Mycoplasma pneumoniae and *Chlamydia pneumoniae* are bacteria that cause atypical pneumonia. In Venezuela, the infection rates of these agents are not known for lack of diagnostic confirmation, due in part to the difficult cultivation of these microorganisms. The polymerase chain reaction (PCR) can be an alternative to a diagnosis sensitive, specific and very rapid. Therefore, the objective of this study was to evaluate PCR as a tool for the diagnosis of infection by *M. pneumoniae* and *C. pneumoniae* from whole blood. To do this, we evaluated samples of whole blood / EDTA from 106 patients with clinical symptoms of respiratory illness treated at the Centro Medico Paso Real, Miranda State. DNA was isolated, and PCR was performed. The results indicate that 13.2% of patients were positive for *Mycoplasma pneumoniae* and 11.3% were positive for *Chlamydia pneumoniae*, a higher frequency in the group of children under 10 years. In conclusion, the PCR in peripheral blood allowed us to make a specific diagnosis of these organisms, suggesting that PCR may be an alternative for differential diagnosis and appropriate for these pathologies.

Key words: polymerase chain reaction (PCR), atypical pneumonia, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, molecular diagnosis.

Introducción

Las enfermedades infecciosas constituyen un importante problema de salud y específicamente la neumonía se encuentra entre las diez primeras causas de muerte a nivel mundial y entre las principales causas de consulta médica en Venezuela. Los agentes causales de infecciones respiratorias son difíciles de distinguir clínicamente, debido a que muchas infecciones virales y bacterianas se presentan con signos y síntomas similares (1-3). Los patógenos atípicos más comunes son *Mycoplasma pneumoniae* (*Mp*) y *Chlamydia pneumoniae* (*Cp*), los cuales son considerados como una importante causa de neumonías adquiridas en la comunidad (NAC), mejor conocidas como neumonías atípicas, siendo también responsables de un amplio espectro de manifestaciones extrapulmonares que incluyen compromiso neurológico, hepático, cardíaco y hematológico (4,5). En la práctica diaria, en muchas oportunidades no se cuenta con la posibilidad de efectuar diagnóstico etiológico por métodos “rápidos” y por lo tanto, estos se sustentan en la presunción de determinados microorganismos en base a la identificación de características tanto epidemiológicas, como clínicas, radiológicas o de laboratorio, usualmente asociadas con ellos (6-8). Entre las pruebas de laboratorio, tradicionalmente el diagnóstico de *Mp* y *Cp* se realiza por métodos serológicos, utilizando o bien un aumento en el título de anticuerpos IgG o en la detección de IgM en fase aguda. Sin embargo, los anticuerpos pueden aparecer después de una semana de inicio de los síntomas, por lo que, en muchos casos, pueden proporcionar un diagnóstico “a posteriori” (9). Además de la baja sensibilidad en fase aguda, las pruebas serológicas, pueden tener también problemas de especificidad (10). En cuanto a los métodos directos de diagnóstico, mediante el cultivo de estos microorganismos, se ha

demostrado que son difíciles de realizar y requieren de mucho tiempo, por lo que no son adecuados en la práctica clínica. Es por ello, que las técnicas de diagnóstico molecular, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), se ha convertido en una alternativa de diagnóstico sensible, específica y rápida para estos microorganismos, sin depender de la variabilidad de la respuesta inmune del paciente.

En Venezuela, son pocos los estudios realizados para evaluar las tasas de infección para estos agentes patógenos, por otro lado, no existen reportes donde se utilice la PCR como herramienta diagnóstica de *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae* a partir de sangre periférica. En este sentido, nos planteamos como objetivo del presente trabajo, realizar un estudio preliminar para evaluar la PCR como herramienta de diagnóstico de *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae* utilizando muestras de sangre total/EDTA de pacientes atendidos en el Centro Médico Paso Real, ubicado en la localidad de Charallave en el estado Miranda, Venezuela, durante el período de octubre- noviembre del 2009. Es por ello, que es importante contar con herramientas de diagnóstico sensibles y específicas que permitan un diagnóstico diferencial que contribuya en la aplicación del tratamiento adecuado.

Materiales y Métodos

Muestras Clínicas: Se utilizaron 106 muestras de sangre total-EDTA de pacientes atendidos en el Centro Médico Paso Real durante los meses de octubre y noviembre del 2009, con sospecha clínica de infección respiratoria que presentaban fiebre, tos, mialgias, síntomas respiratorios y radiografía de tórax con infiltrados intersticiales.

Extracción de ADN: El ADN se extrajo con el kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, se toma 1ml de sangre total-EDTA y se le agregan 0.9 ml de buffer de lisis de células, se incuba la mezcla durante 10 min a temperatura ambiente, se centrifuga a 13000-16000 x g por 50s, se remueve y descarta el sobrenadante tanto como sea posible, sin perturbar el pellet blanco. Luego, se añaden 0.6 ml de buffer de lisis de núcleo y se incuba por 5 minutos a 80 °C. Transcurrido este tiempo se añaden 0.2 ml de la solución de precipitación de proteínas, se agita en vortex vigorosamente por 10-20 s y se incuba en hielo 5 minutos. Posteriormente, se precipita con isopropanol, se resuspende el ADN con solución de rehidratación y se guarda de 2-8°C hasta su uso.

Reacción de Amplificación: La reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se realizó utilizando el multiplex para *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Pneumocystis carini* (Maxim Biotech), siguiendo las instrucciones del fabricante con el siguiente protocolo de amplificación: 2 ciclos de 96 °C/1 min, 58 °C/4 min; 40 ciclos de 94 °C/1 min, 58 °C/2 min y 1 ciclo de 70 °C/10 min, en un termociclador PX2 (Thermo Corporation).

Detección de los productos amplificados: Luego de la reacción de amplificación, los productos fueron separados en un gel de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio, visualizados en un transiluminador UVP y fotografiados para su registro.

Análisis de los Resultados: Los resultados se basan en la presencia o ausencia de señales específicas del ADN amplificado en un gel de agarosa al 2%, a partir de ellas se realizaron tablas de frecuencias para determinar la cantidad de veces que se repiten las variables estudiadas.

Resultados

Una vez realizadas las extracciones de ADN de las muestras en estudio, se procedió a realizar la PCR y los productos de estas reacciones se sometieron a electroforesis en gels de agarosa, tinción y fotodocumentación, tal como se describe en materiales y métodos. En la Figura 1 se muestran las fotos de dos gels de agarosa al 2%, donde se observan las diferentes señales de los productos de amplificación específicos para cada microorganismo estudiado (Control positivo, línea 2) y el producto de amplificación de dos de las muestras positivas evaluadas. En la Figura 1A podemos observar la señal de 871 pb específica para *Chlamydia pneumoniae* (Fig. 1A. línea 3). Mientras que, en la Figura 1B (Línea 3), se observa el producto de 375 pb específico para *Mycoplasma pneumoniae*.

Cuando evaluamos en términos porcentuales los resultados obtenidos, podemos ver que el 13.20 % (15/106) de las muestras evaluadas resultaron positivas para *Mycoplasma pneumoniae* mientras que 11.32 % (12/106) de estas resultó positiva para *Chlamydia pneumoniae* (Tabla I). Una muestra de 50 de los pacientes evaluados, que incluía todos los casos positivos, fue utilizada para realizar una prueba rápida para la detección de anticuerpos. Para ello se utilizó el kit comercial ImmunoCard Mycoplasma (Meridian Bioscience, Inc), encontrándose que solo se detectaron 7 casos positivos para *Mycoplasma pneumoniae*, uno de ellos resultó positivo para *Chlamydia pneumoniae* por PCR.

Posteriormente, realizamos la distribución de frecuencias de pacientes positivos y negativos por grupo etario y tal como se refleja en la Tabla II, 44/106 (59.42%) de las muestras evaluadas corresponden a menores de 10 años, mientras que el 40.58% restante son mayores de 11 años. De las 14 muestras que resultaron positivas para *Mycoplasma pneumoniae*, 10 corresponden a niños menores de 10 años. Igualmente, de los 12 pacientes positivos para *Chlamydia pneumoniae*, 9 son menores de 10 años observándose la mayor frecuencia de estas infecciones en este grupo etario.

Tabla 1

Frecuencia de infección por *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae* utilizando PCR como prueba diagnóstica, obtenidas a partir de sangre total/EDTA en pacientes atendidos en el Centro Médico Paso Real, Charallave, Edo. Miranda, durante octubre y noviembre de 2009.

Microorganismo	N=106	%
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	15	13.20
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	12	11.32

Fuente: Elaboración propia (2017)

Tabla 2

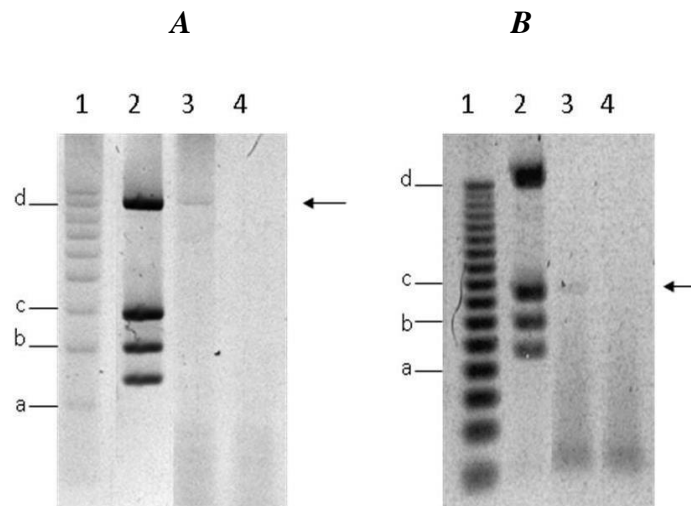
Distribución por edades de las infecciones por *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae*.

Grupo etario	Negativos	Positivos <i>M. pneumoniae</i>	Positivos <i>C.</i> <i>pneumoniae</i>	Total (%)
0 -5 años	30	9	5	44 (41.50)
6 - 10 años	14	1	4	19 (17.92)
11 - 20 años	17	0	1	18 (16.98)
21 – 40 años	8	3	1	12 (11.32)
○ 40 años	11	1	1	13 (12.26)
Total	80	14	12	106

Fuente: Elaboración propia (2017)

Figura 1

Detección de *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae* por Reacción en Cadena de la Polimerasa en muestras clínicas



Fuente: Elaboración propia (2017)

Tabla Figura 1 Detección de *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae* por Reacción en Cadena de la Polimerasa en muestras clínicas. Luego de la reacción de amplificación, los productos fueron separados y visualizados tal como se describe en materiales y métodos. A) Detección de *Chlamydia pneumoniae*. B) Detección de *Mycoplasma pneumoniae*. 1-Marcador de Peso Molecular (a: 200; b: 300; c: 400 y d: 800 pb). 2- Control positivo para: *Chlamydia pneumoniae* 871 pb, *Mycoplasma pneumoniae* 375 pb, *Pneumocystis carini* 300 pb y *Legionella pneumophila* 232 pb. 3- Muestra obtenida de pacientes, se señala con una flecha los productos de amplificación obtenidos en estas muestras. 4- Control negativo.

Discusión:

Aunque raramente se describen casos fatales debido a la infección por *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae*, el diagnóstico preciso de los mismos es importante ya que permitiría aplicar una terapia más efectiva y oportuna. Durante la primera fase de la infección el diagnóstico por métodos serológicos presenta baja sensibilidad y es difícil el cultivo de estos organismos. Por esta razón, una alternativa para su diagnóstico, son las técnicas moleculares como la PCR. En estos casos, la sensibilidad de la reacción varía con el tipo de muestra analizada. En el diagnóstico de neumonías por PCR, se han utilizado muestras respiratorias y no respiratorias. La mayoría de los estudios realizados han evaluado muestras

de vías respiratorias inferiores (especialmente esputo y lavado broncoalveolar), con las cuales se han obtenido buenos resultados. También se han utilizado frotis de garganta o hisopados nasofaríngeos los cuales suelen ser útiles y por lo general fáciles de obtener. Los patógenos también se pueden detectar en muestras de sangre (sangre completa, suero, plasma y leucocitos periféricos) y la orina, pero la utilidad de cada tipo de muestra variará con el tipo de patógeno y la fase de la enfermedad (11-15). En los casos específicos de diagnóstico por PCR de Mp y Cp, las muestras nasofaríngeas parecen ser las más adecuadas por la alta sensibilidad, sin embargo, las muestras de sangre representan una alternativa debido a que ofrecen la ventaja de que son estériles, evitando contaminación por organismos colonizadores y su positividad tiene una correlación directa con la severidad de la enfermedad, por lo que son indicativas de posibles complicaciones (16-20).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican la factibilidad de diagnosticar este tipo de patógenos a partir de sangre total, ciertamente no contamos con una prueba “patrón oro” para verificar nuestros resultados, sin embargo, al compararlos con los signos y síntomas de los pacientes evaluados existe una correlación importante. Por otro lado, con la finalidad de evaluar nuestros resultados, a 50 de las muestras evaluadas por PCR se les realizó la prueba serológica disponible en el laboratorio, y en este grupo se encontró que de las 15 muestras positivas por PCR, solo 6 fueron positivas por prueba rápida, lo cual indica que la PCR es capaz de detectar un mayor número de casos positivos para *Mycoplasma pneumoniae*, a la vez la prueba utilizada discrimina entre *Mycoplasma* y *Chlamydia pneumoniae*.

Además, los resultados obtenidos nos han permitido realizar una primera aproximación para conocer la frecuencia de infección por estos agentes patógenos en la muestra evaluada. Los porcentajes de infección por *Mycoplasma pneumoniae* (13.2%) y *Chlamydia pneumoniae* (11.32%) se asemejan a los datos citados en la bibliografía internacional. Es así, como Denny y col (1986) refieren 15% en Estados Unidos, mientras que, Claesson y col (1989) refieren 10% en Suecia (21), mientras que, Navarrete y col (2003), refieren 8.6 % en Chile (22). Adicionalmente, nuestros resultados sugieren que la infección es más frecuente en niños menores de 10 años, cifras también similares a las reportadas por otros grupos de investigación internacional (23).

Diferentes estudios coinciden en que la neumonía es una causa importante de morbimortalidad en la infancia y que microorganismos como Mp y Cp pueden ser los responsables de 10-15% de las mismas, tal como lo sugieren nuestros resultados. En este sentido, este estudio es una primera aproximación que indica que el diagnóstico por PCR a partir de sangre total, es una herramienta valiosa para tener un diagnóstico preciso, específico y rápido de este tipo de microorganismos en nuestra región, facilitando un diagnóstico diferencial que contribuye en la aplicación de tratamientos adecuados.

Conclusión

Este trabajo nos permitió determinar por primera vez en nuestra región, que la PCR en sangre periférica permite hacer un diagnóstico diferencial y específico de *M. pneumoniae* y *C. pneumoniae*, determinándose que la mayor frecuencia de infección aguda en los pacientes evaluados es 15/106 (13.2%) y 12/106 (11.3%) respectivamente y que los niños menores de 10 años representan la población más afectada.

REFERENCIAS

- Abele-Horn M, Busch U, Nitschko H, **Jacobs E**, Bax R, Pfaff F, et al. Molecular approaches to diagnosis of pulmonary diseases due to *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 1998; 36:548–51
- Beersma M, Dirven K, van Dam A, Templeton K, Claas E, Goossens H: Evaluation of 12 commercial tests and the complement fixation test for *Mycoplasma pneumoniae*-specific immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies, with PCR used as the "gold standard". *J Clin Microbiol.* 2005; 43:2277-2285.
- Blackmore T, Reznikov M, Gordon D. Clinical utility of the polymerase chain reaction to diagnose *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Pathology.* 1995; 27:177–81.
- Block S, Hedrick J, Hammerschlag M et al. *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in pediatric community-acquired pneumonia: comparative efficacy and safety of clarithromycin vs. erythromycin ethylsuccinate. *Pediatr Infect Dis J.* 1995; 14: 471-477
- Claesson B, Trollfors B, Brodin I et al. Etiology of community-acquired pneumonia in children based on antibody responses to bacterial and viral antigens. *Pediatr Infect Dis J.* 1989; 8:856-862.
- Denny F, Clyde W. Acute lower respiratory tract infections in non-hospitalized children. *J Pediatr.* 1986; 108:635-646.
- Dorigo-Zetsma J, Verkooyen R, van Helden H, van der Nat H, van den Bosch J. Molecular detection of *Mycoplasma pneumoniae* in adults with community-acquired pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(3):1184-6.
- Dorigo-Zetsma J, Zaat S, Wertheim-van Dillen P, **Spanjaard L**, **Rijntjes J**, **van Waveren G**, et al. Comparison of PCR, culture, and serological tests for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infection in children. *J Clin Microbiol.* 1999; 37:14–7.
- Ferrero F, González Pena H, Ossorio M, Grenoville M. Consenso sobre infecciones respiratorias agudas bajas en menores de 2 años. Recomendaciones para su manejo. *Arch Argent Pediatr.* 1994; 91:274-288
- García A, Rosón B, Pérez JL, et al. Usefulness of PCR and antigen latex agglutination test with samples obtained by transthoracic needle aspiration for diagnosis of pneumococcal pneumonia. *J Clin Microbiol.* 1999; 37:709
- Honda J, Yano T, Kusaba M, et al. Clinical use of capillary PCR to diagnose *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:1382–4.

- Ieven M, Ursi D, Van Bever H, Quint W, Niesters HGM, Goossens H. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by two polymerase chain reactions and role of *M.pneumoniae* in acute respiratory tract infections in pediatric patients. *J Infect Dis.* 1996; 173:1445–52.
- Isaacs D. Problems in determining the etiology of community acquired childhood pneumonia. *Pediatr Inf. Dis J.* 1989; 8:143-148.
- Kessler H, Dodge D, Pierer K, et al. Rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae* by an assay based on PCR and probe hybridization in a nonradioactive microwell plate format. *J Clin Microbiol.* 1997; 35:1592–4.
- Lezcano A, Balbaryski J, Torres F, Cutri A, Coarasa A, Ossorio M y Ferrero F. Seroprevalencia de anticuerpos anti-*Mycoplasma pneumoniae*: evaluación en niños menores de 12 años. *Arch Argent Pediatr.* 2008; 106(1):6-10.
- Mandell, L. Community-Acquired Pneumonia: Etiology, Epidemiology, and Treatment. *Chest.* 1995; 108:35-42
- 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 Ven Microbiol.* 2007; 27:73-78
- Reznikov M, Blackmore T, Finlay-Jones J, Gordon D. Comparison of nasopharyngeal aspirates and throat swab specimens in a polymerase chain reaction-based test for *Mycoplasma pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1995; 14:58–61.
- Ruiz-Gonzalez A, Falguera M, Nogue's A, Rubio-Caballero M. Is *Streptococcus pneumoniae* the leading cause of pneumonia of unknown etiology? A microbiologic study of lung aspirates in consecutive patients with community-acquired pneumonia. *Am J Med.* 1999; 106:385–90. Saikku, P. Atypical respiratory pathogens. *Clin. Microbiol. Infect.* 1997; 3:599–604.
- Smith R, Viatar L. Neurologic manifestations of *Mycoplasma pneumoniae* infections: diverse spectrum of diseases. A report of six cases and review of the literature. *Clin. Pediatr. (Phila).* 2000; 39: 195-201
- TAN J S. Role of atypical pneumonia pathogens in respiratory tract infections. *Can Respir. J.* 1999; 6:15-9.
- Vikerfors T, Brodin G, Grandien M, Hirschberg L, Krook A, Pettersson CA: Detection of specific IgM antibodies for the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections: a clinical evaluation. *Scand J Infect Dis* 1988, 20:601- 610.