

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LAS INFECCIONES POR *Mycoplasma pneumoniae*

Lurdes Matas y Vicenç Ausina

Servicio de Microbiología. Hospital Universitari Germans Tries i Pujol, Badalona

Mycoplasma pneumoniae es una bacteria de la familia *Mycoplasmataceae* de la clase *Mollicutes* caracterizada especialmente por carecer de pared celular. La clase *Mollicutes* ha evolucionado a partir de células tipo *Clostridium*, mediante sucesivas deleciones genéticas, hasta las células actuales que presentan requerimientos nutricionales específicos y tienen un tamaño menor que la mayoría de bacterias. De hecho, son las bacterias más pequeñas con capacidad de división autónoma y vida libre.

La ausencia de pared celular condiciona muchas de las características del microorganismo, como son su polimorfismo, que no se tiñan mediante la tinción de Gram, su resistencia a los antibióticos β -lactámicos y su elevada sensibilidad a las variaciones de pH, temperatura, tensión osmótica y a los detergentes. En la membrana celular se encuentran los principales determinantes antigénicos, tanto proteicos como glucolipídicos. La proteína P1 es una adhesina de especial importancia para la patogenia del microorganismo y también es la diana de los principales anticuerpos que produce la respuesta inmunitaria del hospedador.

Mycoplasma no puede ser observado con el microscopio óptico. Para su cultivo en el laboratorio es muy exigente, requiriendo un medio rico en esteroides y con precursores de aminoácidos y nucleótidos preformados, lo cual se consigue por la adición de suero y extracto de levadura. Cuando crece no enturbia el medio líquido y para observar las colonias que forma en medio sólido hace falta microscopio.

Mycoplasma pneumoniae es un patógeno primario de las mucosas, mientras que otras especies de *Mycoplasma* no patógenas colonizan la superficie de la mucosa respiratoria. Se transmite de persona a persona por vía aérea pero, debido a su gran sensibilidad a los cambios de temperatura y humedad, necesita un contacto próximo y continuado. Produce infecciones del tracto respiratorio, generalmente en forma de neumonía de la comunidad o infecciones de las vías respiratorias altas.

INFECCIONES PRODUCIDAS POR *Mycoplasma pneumoniae*

Epidemiología

Mycoplasma pneumoniae es un patógeno exclusivamente humano y de distribución universal. Es responsable de un 15-20% de las neumonías adquiridas en la comunidad. Esto supone una frecuencia de 2 casos/1000 personas/año en algunos estudios. Las infecciones se producen sin variaciones estacionales importantes, pero suele presentarse en ciclos epidémicos cada 3-5 años, que se relacionan con el otoño y la primavera. También produce infecciones de vías respiratorias altas, siendo el segundo agente causal después del virus influenza A, cuando se determina la etiología de estos procesos por técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Si bien se sigue considerando a *M. pneumoniae* como un patógeno primario, su aislamiento debe ser valorado cuidadosamente, puesto que pueden persistir en el tracto respiratorio durante un periodo variable de tiempo después de una infección clínicamente resuelta por el tratamiento antibiótico.

Cuadro clínico

Mycoplasma pneumoniae produce infecciones del aparato respiratorio, principalmente en forma de neumonía que, por sus peculiares características de presentación clínico-radiológica se denomina neumonía atípica primaria. Los síntomas se presentan de manera gradual en varios días, y consisten en fiebre, tos no productiva, cefalea y mialgias. A menudo, se acompaña de faringitis, rinitis, otitis y traqueobronquitis. La exploración física se caracteriza por la parquedad de síntomas, auscultándose ligeros subcrepitantes, aunque los pacientes pueden presentar crepitantes francos, *roncus* y sibilantes. En la radiografía de tórax se observan infiltrados reticulonodulillares parahiliares o peribronquiales que pueden ser uni o bilaterales. Puede observarse la presencia de un pequeño derrame pleural en uno de cada cuatro o cinco pacientes. En los análisis complementarios suele encontrarse una discreta leucocitosis en un 30% de los pacientes.

Los niños con alteraciones inmunológicas como la anemia de células falciformes, con anesplenía funcional o con síndrome de Down, pueden desarrollar una infección respiratoria grave y de evolución fulminante. La hipogammaglobulinemia es también un factor de riesgo para las infecciones del tracto respiratorio y de sus complicaciones a nivel articular.

Se han descrito otro tipo de infecciones, aunque en menor frecuencia. Generalmente, acompañan a un cuadro respiratorio, pero pueden aparecer en ausencia absoluta de síntomas de esta localización. En la tabla 1 se relacionan las principales manifestaciones y complicaciones extrapulmonares.

Tabla 1. Infecciones extrapulmonares por *Mycoplasma pneumoniae*.

Sistema nervioso central	Meningoencefalitis, neuritis óptica, parálisis nervios craneales, parálisis ascendente (Síndrome Guillain-Barré), ataxia y psicosis
Piel	Erupción eritematosa papular o vesicular. Síndrome de Stevens-Johnson
Articular	Mialgias, artralgias y poliartropatías Artritis séptica (especialmente en caso de hipogammaglobulinemia)
Cardiaca	Pericarditis, miocarditis y derrame pericárdico
Sistema hematopoyético	Anemia hemolítica asociada con aglutininas frías Púrpura trombótica trombocitopénica
Renal	Glomerulonefritis, nefritis tubulointersticial, nefropatía IgA
Gastrointestinal	Vómitos, diarreas y hepatitis colestásica. Pancreatitis
Otros	Otitis externa, otitis media y miringitis Rabdomiolisis Conjuntivitis, uveítis anterior, retinitis y neuritis óptica Abscesos tubo-ováricos

Patogenia e inmunidad

Mycoplasma pneumoniae es un patógeno extracelular cuya supervivencia depende de su capacidad de adhesiva a las células del epitelio respiratorio. Para ello, ha desarrollado una organela consistente en una estructura con forma de punta, que acumula un conjunto de proteínas y adhesinas, especialmente la denominada P1, una proteína de 170 kDa responsable de la interacción entre el micoplasma y las células del epitelio respiratorio. La pérdida de esta proteína P1 comporta la pérdida de adhesividad y, consecuentemente, de su capacidad patógena. *Mycoplasma pneumoniae* no libera toxinas y las lesiones que

produce se relacionan con el peróxido de hidrógeno que genera durante su actividad metabólica. Actúa conjuntamente con moléculas endógenas de las células del tracto respiratorio y los principales efectos citopáticos que se observan consisten en la pérdida de la actividad de los cilios y la destrucción final del conjunto de la capa epitelial.

La respuesta inflamatoria local consiste en la producción de un infiltrado inflamatorio peribronquial y perivascular formado, principalmente, por linfocitos y células plasmáticas. La respuesta inmune se manifiesta por la rápida producción de anticuerpos frente a los antígenos proteicos y glucolipídicos del microorganismo. En la primoinfección, la dinámica de producción de anticuerpos se inicia con un incremento de IgM, que se acompaña de IgG a las dos semanas. La IgA se produce de manera más precoz y efímera que la IgM. En las reinfecciones se genera una respuesta por IgG e IgA que, tras opsonizar el micoplasma, facilita su fagocitosis y su posterior lisis con ayuda del complemento. Se ha sugerido que la falta de respuesta inmunológica protectora contra la reinfección es debida a que los epítomos inmunodominantes son diferentes de los dominios que condicionan la adherencia.

Diagnóstico

En la neumonía producida por *M. pneumoniae* se detecta, en las pruebas analíticas generales, una moderada leucocitosis, así como la presencia de crioaglutininas entre una y dos semanas después de la infección. La presencia de crioaglutininas es inespecífica, puesto que únicamente aparece en un 50% de los pacientes con neumonía por *M. pneumoniae* y porque también se produce en otras infecciones bacterianas y víricas. La presentación radiológica de la neumonía atípica primaria es muy variable. Se observa afectación bilateral en tan sólo un 20% de los pacientes.

El diagnóstico microbiológico, en la práctica habitual, se ha basado, generalmente, en la demostración de anticuerpos específicos. Varios factores contribuyen a esta situación. En primer lugar las técnicas de cultivo son caras, laboriosas, lentas y no son abordables para la mayoría de laboratorios de diagnóstico clínico. Además, en los cultivos de muestras respiratorias, bien sean aspirados nasofaríngeos, exudados faríngeos o esputos, la presencia de otras especies de micoplasma comensales obliga a realizar pruebas de identificación para *M. pneumoniae*. Las técnicas rápidas para detección de antígeno tampoco han tenido gran aceptación, debido a su baja sensibilidad y especificidad.

La aplicación de técnicas de PCR, bien por técnicas convencionales, bien en sistemas de PCR en tiempo real, ha cambiado algunos de los conceptos epidemiológicos y clínicos que se tenían sobre este micoplasma. Las principales ventajas de estas técnicas radican en su sensibilidad, su rapidez, en la posibilidad de obtener resultados en un día, así como su posible aplicación sobre muestras con elevado inóculo de bacterias acompañantes, en las cuales es muy difícil aislar micoplasma por cultivo. Los mejores rendimientos de PCR se obtienen en muestras de esputo, pero generalmente se realizan en exudado faríngeo, debido a la escasa productividad de la tos que acompaña a la neumonía de esta etiología. Aunque algunos autores prefieren el exudado faríngeo al aspirado nasofaríngeo por la mayor frecuencia de inhibiciones de la PCR en estas muestras, no existen datos concluyentes que demuestren el superior rendimiento de ninguna muestra en concreto. El estudio combinado de diferentes muestras, como siempre ocurre, permite un mayor número de detecciones. La persistencia de micoplasma en las muestras respiratorias, ha sugerido la necesidad de delimitar un número de copias/mL que permita diferenciar la infección clínica de la colonización residual. Actualmente, el desarrollo de técnicas de PCR múltiple, que permiten detectar micoplasma junto a otros patógenos respiratorios como *Chlamydomphila pneumoniae*, puede ser de utilidad en la práctica habitual de los laboratorios de diagnóstico clínico.

En la actualidad, la serología continua siendo el método diagnóstico más ampliamente aplicado para el diagnóstico de las infecciones por *M. pneumoniae*. Las particulares consideraciones que merece este apartado hacen que lo individualicemos del resto de métodos diagnósticos.

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LAS INFECCIONES PRODUCIDAS POR *Mycoplasma pneumoniae*

Técnicas serológicas disponibles

Las primeras determinaciones de la respuesta inmunológica específica frente a *M. pneumoniae* se realizaron por la técnica de fijación del complemento (FC), utilizando como antígenos, bien un extracto lipídico de *M. pneumoniae*, bien una suspensión de lisado bacteriano. La complejidad antigénica de este microorganismo, en comparación con los virus, condiciona un mayor número de resultados inespecíficos. También se observan reacciones cruzadas con los antígenos glucolípidicos de otros micoplasmas. La técnica de FC determina principalmente IgM y, en menor medida, IgG. La demostración de un incremento en cuatro veces el título entre una muestra de la fase aguda y una de la fase de convalecencia, o bien títulos superiores o iguales a 1/32, proporciona una sensibilidad del 90% y una especificidad del 88%.

La complejidad y las múltiples variables a controlar con la técnica de FC han contribuido a que la mayoría de laboratorios busquen otras alternativas de diagnóstico serológico. Las técnicas de inmunofluorescencia (IF) son relativamente fáciles de realizar y permiten un resultado cuantitativo. Sus principales limitaciones son la subjetividad en la interpretación de los resultados obtenidos y la reactividad cruzada con el factor reumatoide.

Las técnicas de aglutinación pasiva utilizan un soporte, como el látex o la gelatina, para una mezcla de antígenos específicos de *M. pneumoniae*. Detectan conjuntamente IgG e IgM, permitiendo también su cuantificación. La aglutinación de partículas de gelatina es de muy fácil realización y considerable especificidad, si bien, para conseguir una máxima sensibilidad se recomienda realizar la determinación en dos muestras seriadas. En un estudio comparativo con técnicas de PCR, Templeton *et al.* (2003), observaron que una muestra de suero de la fase inicial permitía detectar el 50% de las infecciones, y que la sensibilidad alcanzaba el 66%, si se disponía de una muestra de la fase de convalecencia, siempre que se valorasen aglutinaciones a títulos iguales o superiores a 1/320.

Las técnicas de enzoinmunoanálisis (EIA) se han impuesto en la mayoría de laboratorios clínicos. Para la preparación de los reactivos necesarios se utiliza una gran diversidad de preparados antigénicos (proteínas purificadas, péptidos sintéticos, mezcla de antígenos crudos, glucolípidos purificados), que permiten la detección de IgG o de IgM, y en diferentes presentaciones (técnicas de captura- μ , microplacas, en soporte de membrana). Las pruebas de EIA parecen muy sensibles para la detección de anticuerpos específicos, presentando, como siempre, la ventaja de ser automatizables y de necesitar un volumen de suero reducido. Las presentaciones en soporte de membrana permiten determinaciones cualitativas de IgM, generalmente en presentaciones unitarias de fácil realización, y que permiten obtener resultados de manera muy rápida. También existen presentaciones en soporte de membrana que permiten detectar tanto IgG como IgM, y que han demostrado buena sensibilidad y especificidad. En cualquier caso, para alcanzar una buena sensibilidad diagnóstica con las técnicas de EIA, sigue siendo necesario disponer de una muestra de suero del periodo de convalecencia.

La detección de IgA se considera como el mejor indicador de infección aguda, sin embargo, Csángó *et al.* (2004), utilizando reactivos comercializados, encontraron un 68,5% de positividad para esta inmunoglobulina en donantes de sangre.

Principales condicionantes de la respuesta inmunológica a *M. pneumoniae*

Una vez revisadas las técnicas serológicas disponibles, y para evaluar los resultados que se obtienen en función de la técnica aplicada, es conveniente tener presente la dinámica de producción de anticuerpos frente a esta bacteria. La respuesta inmunológica en la primera infección por *M. pneumoniae* se produce rápidamente, alcanzando la máxima concentración de anticuerpos en unas 3-6 semanas para, seguidamente, disminuir gradualmente durante meses o años. Las IgM específicas anti-*Mycoplasma* aparecen durante la primera semana de la infección y preceden, en unas 2 semanas, a las IgG. A menudo, los anticuerpos están presentes en el momento de la sintomatología clínica, debido al largo periodo de incubación. Es decir, estamos frente a una bacteria que en la primera infección, que acostumbra a suceder en el niño pequeño, produce una respuesta inmunológica clásica sin dejar inmunidad permanente.

En la reinfección no hay respuesta de IgM, sino una rápida elevación de IgG que se acompaña de producción de IgA. Además, se ha observado que, si se produce IgM, puede persistir durante meses o años, de modo que en el adulto joven la detección de IgM puede no responder a una infección reciente. Así, en la primoinfección las técnicas de detección de IgM tienen una buena sensibilidad y especificidad, mientras que, en las reinfecciones, la falta de detección de IgM específica no permite descartar una infección aguda por *M. pneumoniae*.

Otros factores que debemos también tener en cuenta para el diagnóstico etiológico de estas infecciones por serología, es el hecho de que, al tratarse por lo general de una patología no grave, incluso se le ha denominado la neumonía del paseante (*walking pneumonia*), no requiere ingreso del hospitalario en la mayoría de los enfermos, y su recuperación, relativamente rápida, dificulta el cumplimiento de recogida de una segunda muestra, especialmente en niños pero también en adultos.

Estos patrones epidemiológicos clásicos deben ser replanteados debido al cambio de costumbres y a las posibilidades diagnósticas de las nuevas técnicas de PCR. Actualmente, sabemos que la primoinfección se da cada vez con más frecuencia en niños de 3-4 años o incluso menores, cuando antes se creía muy rara por debajo de los cinco años. También se encuentra una frecuencia mayor de la esperada en personas de edad avanzada. Asimismo, contribuye al problema diagnóstico de esta entidad el hecho de que en el adulto, con frecuencia, ocurran infecciones asintomáticas o muy leves, que tal vez puedan relacionarse con un cierto grado de inmunidad debida a infecciones previas.

Con todas las premisas anteriores, en el momento de plantear el diagnóstico de las infecciones por *M. pneumoniae* en el laboratorio, se deben seleccionar las técnicas no sólo por criterios funcionales (posibilidad de automatización, respuesta minuto, etc.) sino también adecuándolas al grupo poblacional. Las técnicas de EIA para detección específica de IgM no deberían ser aplicadas en las infecciones de los niños mayores ni de los adultos, dado que las reinfecciones no condicionan una buena respuesta de IgM. Además, los reactivos comercializados deben ser valorados cuidadosamente, sobre todo por lo que respecta a su especificidad. Tampoco resulta práctico plantear el diagnóstico en base a la demostración de IgG, con seroconversión o incremento significativo del título, puesto que ello nos obliga a un diagnóstico muy tardío que, en una patología generalmente leve, es de muy difícil cumplimiento. Con cierto pragmatismo, y con criterios de oficio, parecen más útiles las

técnicas que detectan tanto IgG como IgM, puesto que permiten el diagnóstico de la primera infección ya en el momento de la consulta, especialmente en los niños pequeños. Un porcentaje considerable de casos quedarán diagnosticados ya con la primera muestra de suero, pero además, la dinámica de producción de anticuerpos, permite, a menudo, confirmar un diagnóstico dudoso simplemente repitiendo la determinación dos o tres días después. Únicamente en casos seleccionados será necesario esperar 2-3 semanas para observar seroconversión o incremento significativo del título de anticuerpos.

BIBLIOGRAFÍA

- WAITES KB, TALKINGTON DF. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. Clin Microbiol Rev 2004; 17:697-728.
- AUSINA V, RODRIGO C. Infecciones causadas por micoplasmas. En: Farreras-Rozman (eds). Medicina Interna, 15ª ed. Madrid: Elsevier España SA, 2004; pp 2362-2365.
- 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; 11:862-867.
- MICHELOW IC, OLSEN K, LOZANO J, DUFFY LB, MCCracken GH, HARDY RD. Diagnostic utility and clinical significance of naso- and oropharyngeal samples used in a PCR assay to diagnose *Mycoplasma pneumoniae* infection in children with community-acquired pneumonia. J Clin Microbiol 2004; 42:3339-3341.
- TEMPLETON KE, SCHELTINGA SA, GRAFFELMAN AW, VAN SCHIE JM, CRIELAARD JW, SILLEKENS P, *ET AL*. Comparison and evaluation of real-time PCR, real-time nucleic acid sequence-based amplification, conventional PCR, and serology for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae*. J Clin Microbiol 2003; 41:4366-4371.
- CSANGO PA, PEDERSEN JE, HESS RD. Comparison of four *Mycoplasma pneumoniae* IgM-, IgG- and IgA-specific enzyme immunoassays in blood donors and patients. Clin Microbiol Infect 2004; 10:1094-1098.
- WAITES KB, BÉBÉAR CM, ROBERTSON JA, TALKINGTON DF, KENNY GE. Laboratory diagnosis of mycoplasmatal infections. Cumitech 34; Washington: ASM Press, 2001.
- RAZIN S, YOGEV D, NAOT Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Microbiol Mol Biol Rev 1998; 62:1094-1156.
- MATAS L, DOMÍNGUEZ J, DE ORY N, GARCÍA N, GALÍ P, CARDONA PJ, *ET AL*. Evaluation of Meridian ImmunoCard Mycoplasma test for the detection of *Mycoplasma pneumoniae*. Scand J Infect Dis 1998; 30:289-293.