

**DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA
DE *Mycoplasma pneumoniae* EN LA POBLACIÓN
PEDIÁTRICA CON NEUMONÍA DE LA CLINICA DEL NIÑO.**

MARIA MARGARITA LIZARAZO RODRIGUEZ

ERIKA MERCEDES LOSADA ANDRADE

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial para optar al titulo de

BACTERIÓLOGA

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGIA**

Bogotá, Junio de 2001

**DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA
DE *Mycoplasma pneumoniae* EN LA POBLACIÓN
PEDIÁTRICA CON NEUMONÍA DE LA CLINICA DEL NIÑO.**

MARIA MARGARITA LIZARAZO RODRIGUEZ

ERIKA MERCEDES LOSADA ANDRADE



Dra. MARCELA GÓMEZ
Directora

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGIA**

Bogotá, Junio de 2001

**DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA
DE *Mycoplasma pneumoniae* EN LA POBLACIÓN
PEDIÁTRICA CON NEUMONÍA DE LA CLINICA DEL NIÑO.**

MARIA MARGARITA LIZARAZO RODRIGUEZ

ERIKA MERCEDES LOSADA ANDRADE


Dra. CLAUDIA VALDIVIESO
Jurado


Dr. FREDY GAMBOA
Jurado

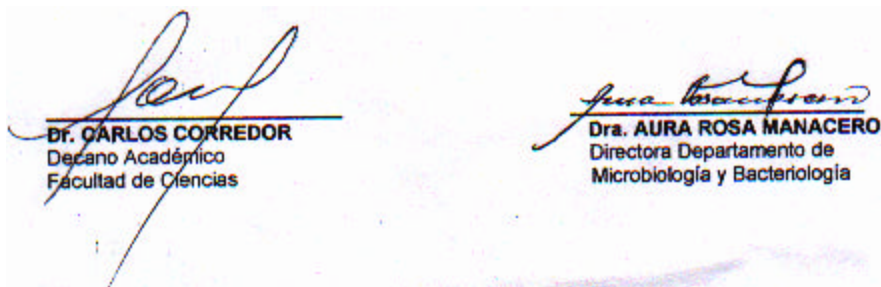
**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGIA**

Bogotá, Junio de 2001

**DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA
DE *Mycoplasma pneumoniae* EN LA POBLACIÓN
PEDIÁTRICA CON NEUMONÍA DE LA CLINICA DEL NIÑO.**

MARIA MARGARITA LIZARAZO RODRIGUEZ

ERIKA MERCEDES LOSADA ANDRADE



Dr. CARLOS CORREDOR
Decano Académico
Facultad de Ciencias

Dra. AURA ROSA MANACERO
Directora Departamento de
Microbiología y Bacteriología

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGIA**

Bogotá, Junio de 2001

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de Julio de 1946 : “La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus Tesis de Grado”.

A Dios y a mis padres quienes con esperanzadora resignación me tejieron estas alas para partir lejos de casa en procura de empezar a escribir mi propia historia de un ideal.

A los que durante todo este tiempo día a día, mes a mes y año tras año me transmitieron sus conocimientos, también adquiridos un día en la Universidad, convencidos no sólo de legarlos sino además de formar un talante colombiano capaz de avanzar hacia una sociedad más justa, más honesta y más próspera.

A quienes le apostaron a este sueño mío hoy hecho posible; a aquellos que me animaron con su voz de aliento cuando sentía desfallecer en medio de las dificultades ocasionales de este anhelo.

... Y a mi misma, por experimentar la sensación terrenal del que ya ha llegado a la cumbre para airear el alma y sentirse privilegiado de dominar con la mirada un infinito horizonte de posibilidades que se abre por todos los costados.

Erika

Gracias doy a Dios por permitirme dar
este nuevo paso en mi camino.

Dedico este triunfo,
a mis padres y hermano,
presencia desinteresada y amorosa
y a mis familiares, maestros y amigos,
que de una u otra forma han sido, son
y serán parte importante en mi vida.

María Margarita

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Marcela Gómez, docente del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana, que con su gran conocimiento, experiencia, colaboración y apoyo incondicional, orientó adecuadamente la realización de este trabajo.

A los Doctores Jorge Gutiérrez, médico pediatra y Reuven Himelfarb, Neumólogo pediatra de la Clínica del Niño, por su interés en el trabajo y colaboración en la obtención de las muestras.

Al Doctor Mauricio Luna, Infectólogo de la Clínica del Niño, por la acertada orientación clínica y colaboración durante la obtención de las muestras requeridas.

Al personal de Urgencias y Hospitalización de la clínica del Niño, por la colaboración durante la recolección de las muestras.

A nuestras compañeras y demás personal del Laboratorio de Microbiología Especial de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana, por su ayuda en el transcurso de la realización de esta investigación.

A todas aquellas personas que de una u otra manera colaboraron para que este estudio se hiciera realidad.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEORICO	3
2.1. GENERALIDADES	3
2.2. EPIDEMIOLOGIA	5
2.3. PATOGÉNESIS	7
2.4. MECANISMOS DE DEFENSA	10
2.4.1. Respuesta Inespecífica	10
2.4.2. Inmunidad Específica	11
2.5. MANIFESTACIONES CLINICAS	12
2.5.1 Manifestaciones Respiratorias	12
2.5.2. Manifestaciones extrapulmonares	12
2.6. DIAGNOSTICO	14
2.6.1. Medios de cultivo	15
2.6.2. Coloración "Naranja de Acridina"	15
2.6.3. Prueba de Hemadsorción	16
2.6.4. Reducción de Tetrazolio	17
2.6.5. Inmunofluorescencia Directa	17
2.6.6. Pruebas serológicas	18
2.6.6.1. Fijación del complemento	18
2.6.6.2. Crioaglutininas	18
2.6.6.3. Inmunofluorescencia indirecta y Elisa	19
2.6.7. PCR (Reacción en la Cadena de la Polimerasa)	19
2.7. TRATAMIENTO	19

3. JUSTIFICACIÓN	21
4. OBJETIVOS	23
4.1. OBJETIVO GENERAL	23
4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	23
5. METODOLOGÍA	24
5.1. TIPO DE ESTUDIO	24
5.2. POBLACIÓN PARA EL MUESTREO	24
5.2.1. Criterios de Inclusión	24
5.2.2. Criterios de Exclusión	25
5.3. MUESTRA	26
5.4. MEDIOS DE CULTIVO	26
5.4.1. Caldo PPLO	26
5.4.2. Medio Bifásico Azul de Metileno-Glucosa	26
5.5. PRUEBA DE ORIENTACIÓN	27
5.5.1. TEST – SPOT Coloración Naranja de Acridina	27
5.6. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN	27
5.6.1. Resiembra	27
5.6.2. Prueba de Hemadsorción	28
5.6.3. Reducción de Tetrazolio	28
5.6.4. Prueba de Inmunofluorescencia Directa	29
5.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	29
6. RESULTADOS	30
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	41
8. CONCLUSIONES	48
9. RECOMENDACIONES	50
BIBLIOGRAFÍA	51
ANEXOS	56

LISTA DE GRÁFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Distribución de frecuencia por género de 112 pacientes que ingresaron a la Clínica del Niño con diagnóstico de Neumonía y Bronconeumonía	30
Gráfica 2. Porcentaje de pacientes positivos para <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	31
Gráfica 3. Distribución de frecuencia por género de los pacientes con diagnóstico positivo para <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	34
Gráfica 4. Distribución de frecuencia de las variables presentes en los pacientes con diagnóstico positivo para <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	35
Gráfica 5. Distribución de frecuencia del resultado Radiológico presente en los pacientes con diagnóstico positivo para <i>M. pneumoniae</i>	36
Gráfica 6. Distribución de frecuencia del resultado del Cuadro Hemático en los pacientes con diagnóstico positivo para <i>M. pneumoniae</i>	37

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Relación por edad y género de 112 pacientes que ingresaron a la Clínica del Niño con diagnóstico de Neumonía y Bronconeumonía	31
Tabla 2. Distribución de frecuencia de las variables del estudio en los 112 pacientes que ingresaron a la Clínica del Niño con diagnóstico de Neumonía y Bronconeumonía	35
Tabla 3. Valores de Referencia Cuadro Hemático	37
Tabla 4. Relación entre el diagnóstico positivos de <i>M. pneumoniae</i> y los títulos de Crioaglutininas	38
Tabla 5. Relación entre el diagnóstico de <i>M. pneumoniae</i> usando como Prueba de Oro el Medio Bifásico	39
Tabla 6. Relación entre el medio Bifásico con el TEST – SPOT Naranja de Acridina	39

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Medios de Cultivo	32
Figura 2. Colonia característica de <i>M. pneumoniae</i> en forma de huevo frito vista en aumento de 50X	32
Figura 3. Prueba de Hemadsorción positiva para <i>Mycoplasma pneumoniae</i> vista en aumento de 50X	33
Figura 4. Reducción de Tetrazolio	33
Figura 5. Inmunofluorescencia directa para <i>M. pneumoniae</i> vista en aumento de 100X	33
Figura 6. Neumonía por <i>Mycoplasma pneumoniae</i> con infiltrado pulmonar derecho	36
Figura 7. Crioaglutininas	38
Figura 8. TEST – SPOT Coloración Naranja de Acridina vista en aumento de 100x	40

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. TEST - SPOT "Coloración Naranja de Acridina"	56
Anexo 2. Caldo PPLO	58
Anexo 3. Medio bifásico azul de metileno -glucosa	59
Anexo 4. Agar modificado para <i>Mycoplasma</i>	60
Anexo 5. Prueba de Hemadsorción	61
Anexo 6. Reducción de Tetrazolio	63
Anexo 7. Prueba de Inmunofluorescencia Directa	65
Anexo 8. Composición de los Medios de cultivo usados para la identificación de <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	67
Anexo 9. Tabulación de datos	68

RESUMEN

Mycoplasma pneumoniae es un patógeno humano que se encuentra en el tracto respiratorio y es uno de los agente etiológico de neumonía atípica que afecta principalmente a niños y adultos jóvenes. Actualmente en Colombia no se realiza un diagnóstico específico para *M. pneumoniae*. El cuadro clínico que presenta el paciente es manejado por el médico de acuerdo con su sintomatología (tos, rinorrea, fiebre, dolor pleural) y el tratamiento se basa en parámetros como título de crioaglutininas y radiografía de tórax compatibles con neumonía atípica, pruebas no diagnósticas para *Mycoplasma pneumoniae*.

Este estudio se le realizó a 112 pacientes pediátricos (1 a 4 años de edad) de la Clínica de Niño, que asistieron al servicio de Urgencias y fueron Hospitalizados, con diagnóstico de neumonía y bronconeumonía; de los cuales al 73% se les detectó la presencia de *Mycoplasma pneumoniae* en cultivos de hisopados nasales en Agar PPLO y medio Bifásico azul de metileno-glucosa y su identificación por Hemadsorción, Reducción de tetrazolio e Inmunofluorescencia Directa.

En las muestras directas de los hisopados se determinó el 100% de sensibilidad y el 100% de especificidad para la Coloración Naranja de Acridina, como prueba presuntiva en la determinación de *M. pneumoniae*.

Finalmente se evaluó la utilidad de las crioaglutininas como prueba diagnóstica obteniéndose una sensibilidad del 15.9% y una especificidad del 94.5%, la especificidad pudo haber sido alta debido a que la población estudiada cumplió con criterios de inclusión asociados a enfermedad respiratoria, lo que podría haber excluido a los otros microorganismos que causan aumento en los títulos de crioaglutininas.

1. INTRODUCCIÓN

El nombre genérico *Mycoplasma* se deriva del griego “MYCO” que quiere decir filamento o micelio y del latín “PLASMA” que se refiere a la plasticidad y pleomorfismo del mismo (Delgadillo, 1993).

Los Micoplasmas son bacterias pequeñas y pleomórficas. En la actualidad se conoce que han evolucionado de ancestros Gram positivos tipo Clostridios. En su evolución han perdido la pared celular y han reducido el tamaño de su genoma hasta el punto de poseer el genoma más pequeño de las Eubacterias conocidas. Los Micoplasmas tienen como característica distintiva el no poseer pared celular por lo tanto presentan pleomorfismo y no son visibles al microscopio con coloración de Gram. El contenido celular está envuelto por una membrana celular triple de 8 – 10 nm de espesor, compuesta de esteroides que se encuentran exclusivamente en este grupo de bacterias. Tiene un porcentaje bajo de guanina y citosina, metabolismo fermentativo, algunos de ellos son anaerobios facultativos y algunos requieren esteroides para su crecimiento (Restrepo, 1998)

Por ser bacterias con un genoma pequeño requieren de muchos substratos externos para su metabolismo, lo cual se traduce en la necesidad de utilizar medios enriquecidos para su cultivo que contengan precursores para la biosíntesis de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. Las colonias características observadas en agar son las descritas con apariencia de huevo frito en las cuales se observa un centro denso con un halo alrededor, apariencia dada por las colonias creciendo en el interior del agar como consecuencia de la falta de pared celular (Restrepo, 1998)

Se han descrito más de 100 especies de Micoplasmas, pero solo el *M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. genitalium*, *M. fermentans*, *M. penetrans*, *M. salivarium*, *M. orale* y *M. faucium* se han relacionado con enfermedades humanas, siendo *M. pneumoniae* el principal asociado con patología humana. Todas estas especies producen ATP por medio de la fosforilación a nivel de substrato realizada por la ácido fosfoglicérico quinasa y la piruvato quinasa, dos enzimas de la vía glucolítica (Koneman, 1999).

El *Mycoplasma pneumoniae* es una causa bien reconocida de neumonía atípica; puede aislarse en pacientes asintomáticos, lo cual sugiere que puede comportarse principalmente como patógeno oportunista. La ausencia de pared celular bacteriana típica con peptidoglicanos torna a estos microorganismos resistentes a los agentes antimicrobianos activos sobre la

pared celular, como las penicilinas y las cefalosporinas (β - lactámicos) .
(Koneman, 1999).

2. MARCO TEORICO

2.1. GENERALIDADES

Mycoplasma pneumoniae fue descrito por primera vez en 1944 por Eaton, y fue llamado agente Eaton hasta 1960 cuando Chanock cultivó el agente en agar, renombrándolo como *Mycoplasma pneumoniae*, y relacionándolo como la primera causa de neumonía atípica (Koneman 1999).

Los Micoplasmas son los microorganismos de vida libre más pequeños que se conocen, cada célula mide entre 100 y 300 nm (0.1 – 0.3 μm) de diámetro. El género incluye más de 100 especies y residen habitualmente en las plantas, los animales y los seres humanos. Se han aislado 13 especies de *Mycoplasma* del ser humano *M. hominis*, *M. genitalium*, *M. fermentans*, *M. primatum*, *M. spermatophilum* y *M. penetrans* se encuentran principalmente en el tracto genital humano, mientras que *M. pneumoniae*, *M. salivarium*, *M. orale*, *M. bucale*, *M. faucium*, y *M. lipophilum* pueden recuperarse del tracto respiratorio humano. El nicho ecológico de *M. pirum* en el humano es incierto. *M. salivarium* se halla en surcos gingivales y puede desempeñar un papel importante en enfermedades periodontales; *M. primatum* y

M. spermatophilum son flora normal del tracto genitourinario, mientras que *M. hominis* y *M. genitalium* se consideran patógenos; *M. fermentans* y *M. penetrans* se encuentran en tracto genitourinario de pacientes con SIDA por lo que se consideran cofactores y *M. pneumoniae* es el único patógeno humano definido y bien conocido causante de neumonitis, llamada también neumonía atípica (Koneman, 1999).

M. pneumoniae representa una etiología frecuente de traqueobronquitis y de otros síndromes respiratorios como faringitis y crup. Los síntomas clásicos como tos, fiebre, dolor pleural, faringitis, rinorrea y pleurodinia pueden persistir durante semanas o meses (Restrepo, 1998).

2.2. EPIDEMIOLOGÍA

Mientras la mayoría de las enfermedades infecciosas disminuyen en los países en vías de desarrollo, las infecciones respiratorias agudas, tanto virales como bacterianas, permanecen sin modificaciones y lo que es más grave, se subestima la magnitud de su problema (Jiménez, 1986).

M. pneumoniae se transmite a través de los aerosoles de una persona a otra. A diferencia de otras infecciones respiratorias este contagio interpersonal de las infecciones por *Mycoplasma* ocurre lentamente, por medio de aerosoles, por la tos o estornudos del paciente infectado y convivencia entre miembros de una misma familia (Restrepo, 1998)

En las grandes ciudades la infección por *M. pneumoniae* tiene un carácter endémico y se mantiene todo el año. Las epidemias se manifiestan cada 3 a 7 años (Harrison, 1998).

Anteriormente se pensaba que *M. pneumoniae* era una infección rara en los niños menores de 5 años y sólo causaba un proceso respiratorio agudo de evolución limitada. Sin embargo, los estudios más recientes señalan que la incidencia podría alcanzar el máximo entre los 3 y 4 años de edad y que la tasa de hospitalización por neumonía causada por *M. pneumoniae* es elevada entre los niños menores de 5 años. Según algunos estudios recientes en adultos (con edad media de 62 años), *M. pneumoniae* justifica hasta un 15% de los casos de neumonía adquirida en la comunidad en este grupo de edad. Los estudios prospectivos de adultos (edad media de 56 años) que precisan hospitalización por neumonía adquirida en la comunidad han confirmado que hasta un 18% de todos los casos obedecen a *M. pneumoniae* (Harrison, 1998).

La mayor parte de los casos de infección respiratoria por micoplasmas ocurren en forma aislada o como brotes familiares. En poblaciones cerradas tales como los campos de reclutamiento militar, hogares de beneficencia y niños escolares los micoplasmas representan del 25 – 75% de las neumonías (Smit, 1986)

Delgadillo en su artículo de 1993 cita que la infección por *Mycoplasma pneumoniae* es cosmopolita, aunque la mayoría de los casos se han documentado en climas templados, sin predominio estacional. *M. pneumoniae* es endémico de áreas urbanas, pero epidemias prolongadas pueden ocurrir en intervalos de cuatro a ocho años tanto en poblaciones civiles como militares. El periodo epidémico se ha presentado de inicio lento y duración prolongada (dos años o más) en niños y adultos jóvenes.

La frecuencia de la neumonía por *Mycoplasma* varía de acuerdo con la población estudiada y puede ser un 4% en población abierta, y del 25-75% en poblaciones cerradas (guarderías, internados, instituciones militares, reformatorios entre otras); Delgadillo en su artículo de 1993 cita que diferentes estudios han encontrado al *Mycoplasma pneumoniae* como el agente etiológico del 51% de las neumonías en niños de 5 a 9 años y el 74% entre los 9 y los 15 años, además fue la primera causa de traqueobronquitis y enfermedad respiratoria con sibilancias con estos grupos de edad. Cuadros respiratorios que se documentaron más frecuentemente en niñas pero más severos en varones.

2.3. PATOGÉNESIS

El pulmón esta protegido contra infecciones bacterianas por una variedad de mecanismos que incluyen la filtración de las partículas en las fosas nasales , prevención de aspiración de secreciones infectadas por el epiglotis,

expulsión de materiales aspirados por el reflejo tusígeno, expulsión de microorganismos por el moco y las células ciliadas, ingestión y muerte de bacterias por macrófagos alveolares, neutralización del microorganismo por complemento, opsoninas o anticuerpos, y transporte de partículas del pulmón por el drenaje linfático. La infección bacteriana se presenta cuando una de estas barreras se altera (Gayton, 1987).

Las bacterias inhaladas penetran a través de las vías respiratorias altas y del árbol traqueobronquial. Las partículas mayores de 10 μm son atrapadas en nariz y faringe, el 90% de las partículas de 2 a 10 μm de diámetro son depositadas en el área mucociliar que abarca desde los bronquiolos hasta la traquea, y las partículas más pequeñas de 3 a 5 μm penetran a los alvéolos (Gayton, 1987). La alteración en la función mucociliar, durante las primeras tres a cuatro horas después de haberse depositado las bacterias, permite la multiplicación de microorganismos en la superficie o dentro de las superficies mucosas. Las bacterias depositadas en los bronquiolos terminales, los ductos alveolares y alvéolos son inactivadas inicialmente por los macrófagos alveolares y polimorfonucleares. La adherencia inicial de las bacterias a las superficies epiteliales, ocurre por los pilis y adhesinas. Las exotoxinas y enzimas proteolíticas pueden degradar la IgA, lo cual disminuye las defensas y permite la colonización. El contenido alveolar contiene surfactante, fibronectina, IgG y complemento lo que permite la opsonización de la

bacteria. La presencia de macrófagos alveolares permite eliminar el microorganismo; no obstante si la cantidad de microorganismo excede a los macrófagos, entonces estos se vuelven mediadores inflamatorios produciendo citoquinas que atraen neutrófilos al pulmón. Se han encontrado citoquinas que juegan un papel importante en este proceso como el factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleuquina 1, lo cual permite mantener una respuesta inflamatoria pulmonar (Diagama, 1999)

La infección por *Mycoplasma pneumoniae* es adquirida a través de gotas de saliva y contacto persona a persona desde 5 días antes de la aparición de los signos y síntomas de esta enfermedad. Es de instauración insidiosa y presenta un periodo de incubación de aproximadamente 7 a 21 días (Smit, 1986).

La infección comienza por la adherencia de un extremo del microorganismo a un receptor en la superficie del epitelio respiratorio; proceso mediado por una adhesina terminal especializada asociada a la membrana denominada P1 (proteína de 169 kDa). Luego de la adherencia, *M. pneumoniae* produce peróxido de hidrógeno y radicales superóxido, causando daño a las células epiteliales y al aparato ciliar, con las consecuentes alteraciones en el metabolismo de limpieza del tracto respiratorio. La cilio éstasis explica la prolongada tos que se asocia a la infección por *M. pneumoniae* (Koneman, 1999).

Delgadillo en su artículo de 1993 cita que la presencia del microorganismo en las secreciones nasales se han encontrado entre dos y ocho días previos a la sintomatología, siendo la concentración mas elevada los 4 primeros días y persistiendo en numero bajo por periodos prolongados de 10 a 14 semanas.

La presentación clínica de la neumonía por *Mycoplasma*, se caracteriza por la aparición gradual de síntomas constitucionales y neumónicos que simulan una gripe. La mayoría de los pacientes pueden tener fiebre (hasta 39° C), escalofríos, malestar general, odinofagia, congestión nasal y tos (Koneman, 1999).

2.4. MECANISMOS DE DEFENSA

2.4.1. Respuesta Inespecífica

Se sintetizan anticuerpos circulantes contra diversos antígenos de *Mycoplasma pneumoniae*. Los más conocidos debido a su utilidad diagnóstica son las crioaglutininas, anticuerpos de tipo IgM que se pueden unir al antígeno I de los eritrocitos, por reacciones antigénicas cruzadas entre el microorganismo y la membrana de los hematíes, reacción que se pone en evidencia a muy bajas temperaturas. Las crioaglutininas se incrementan rápidamente en pacientes con compromiso neumónico por *M. pneumoniae* llegando al máximo a las 3 o 4 semanas del comienzo de la enfermedad y luego desaparecen. Un título elevado de crioaglutininas no es

patognómico de neumonía atípica por *Mycoplasma*, ya que aumentan tanto en trastornos infecciosos como no infecciosos (adenovirus, hepatitis, cirrosis, tripanosomiasis, tuberculosis, cánceres, linfoma, trastornos de la colágena vascular). Su valor clínico, como toda prueba de laboratorio, radica en su concordancia con la clínica y con otras pruebas diagnósticas como radiografía de tórax, siendo de gran utilidad títulos elevados en sospecha de neumonía atípica por *Mycoplasma* (Tintinalli, 1998).

2.4.2. Inmunidad Específica

Una vez adquirida la infección por *Mycoplasma pneumoniae*, el organismo produce una respuesta inmune específica, tanto local como sistémica, que inicialmente incluye anticuerpos IgA, IgM e IgE. Los anticuerpos séricos específicos IgA locales, aparecen de 2-4 semanas después del comienzo de la infección y desaparecen de modo gradual a lo largo de 6 a 12 meses. Posterior al curso de la enfermedad y en el periodo de recuperación, predominan los anticuerpos tipo IgG y se han reportado casos de persistencia de anticuerpos tipo IgM por meses o por años después de la infección. La presencia de anticuerpos es numéricamente más baja en niños que en adultos. Hay poca evidencia de inmunidad celular específica en niños menores de 4 años con infección documentada, mientras que en adultos y niños mayores si se ha apreciado estimulación específica de LT en más del 60% de los casos, demostrando así la relación entre la edad y la inmunidad celular específica (Delgadillo, 1993)

La respuesta inflamatoria se da inicialmente por polimorfonucleares y luego por linfocitos, macrófagos y monocitos que infiltran la submucosa de la traquea, bronquiolos y tejido peribronquial (Restrepo, 1998).

2.5. MANIFESTACIONES CLINICAS

2.5.1. Manifestaciones Respiratorias

M. pneumoniae es un patógeno causante de neumonías, traqueobronquítis y faringitis. El inicio de la enfermedad es gradual y usualmente encabezado por cefalea, malestar y fiebre baja. Tos no productiva incontrolable es encontrada en el 90 a 100% de los pacientes. El esputo se produce raramente. Dolor de los músculos del pecho por la tos prolongada puede estar presente, pero el dolor pleurítico es poco frecuente (Tintinalli, 1998).

En los Rayos X de tórax se observan cambios que van desde las densidades a manera de parche hasta la consolidación densa de un lóbulo completo. La neumonía intersticial aguda, caracterizada por su forma reticulonodular, suele acompañarse de disfunción pulmonar significativa, que en ocasiones origina insuficiencia respiratoria. Se han descrito cavidades, abscesos, derrames pleurales significativos, infiltrados intersticiales y atelectasia en pacientes cuyos datos clínicos sugieren infección por *Mycoplasma* (Tintinalli, 1998)

2.5.2. Manifestaciones Extrapulmonares

Suelen comenzar 1 a 21 días después de los síntomas respiratorios. Sin embargo algunos enfermos no refieren antecedentes respiratorios y otros sólo evocan una enfermedad respiratoria alta. Se han descrito manifestaciones extrapulmonares en todos los grupos de edad. (Harrison, 1998)

Delgadillo cita en su artículo de 1990 que las lesiones del SNC tienen una incidencia del 7% en los pacientes hospitalizados con antecedentes de infección de vías respiratorias, se describen: meningoencefalitis, meningitis aséptica, mielitis transversa, neuropatías, poliomielitis, síndrome de Guillain-Barré. El pronóstico es variable, con una mortalidad del 10%, el diagnóstico se hace por aislamiento del microorganismo del LCR.

Las manifestaciones dermatológicas usualmente consisten en un rash eritematoso maculopapular o vesicular debido a que *M. pneumoniae* puede causar síndrome de Stevens-Johnson, enfermedad inflamatoria grave que se caracteriza por fiebre y úlceras en las membranas de las mucosas de los labios, los ojos, la boca, las vías nasales y las genitales (Harrison, 1998). Este síndrome se ha reportado hasta en un 7% de los pacientes con neumonía por micoplasmas (Smit, 1986)

En el artículo de 1990 Delgadillo cita que a nivel gastrointestinal se han reportado casos de disfunción hepática, hepatitis reactiva no específica y pancreatitis, durante o después de infección respiratoria por *Mycoplasma pneumoniae*. Y que el compromiso cardíaco es poco frecuente (4,5% en algunos estudios), las complicaciones reportadas han sido miocarditis, pericarditis, arritmias cardíacas y hemopericardio.

2.6. DIAGNÓSTICO

La posibilidad de una infección por *M. pneumoniae* debe tenerse en cuenta en pacientes de cualquier edad y que presenten manifestaciones respiratorias. Las complicaciones son en principio raras, pero su incidencia verdadera se ha desvalorado, debido a la impresión errónea de que una neumonía grave con complicaciones extrapulmonares no es compatible con una enfermedad por *M. pneumoniae*, esta etiología no se incluye, por desgracia, en el diagnóstico diferencial de muchos casos (Harrison, 1998).

El examen físico y la sintomatología son claves para el diagnóstico de *M. pneumoniae*, principalmente los hallazgos pulmonares o radiográficos, los cuales son compatibles con bronconeumonía difusa, que en general involucra a múltiples lóbulos del pulmón. El patrón más frecuente es el de engrosamiento bronquial con zonas de infiltración intersticial y atelectasias subsegmentarias, linfadenopatías hiliares, afectando a uno de los lóbulos inferiores. Los derrames pleurales son relativamente raros en la neumonía

por *Mycoplasma*, se detectan hasta en el 20% de los pacientes (Koneman, 1999)

El cuadro hemático, generalmente presenta un recuento leucocitario normal o ligeramente aumentado, el diferencial es normal o con predominio de neutrófilos, es frecuente la trombocitosis, la detección de reticulocitosis revela una anemia subclínica, la VSG se encuentra aumentada; Coombs directo puede ser positivo según el nivel de crioaglutininas circulantes; el parcial de orina revela en ocasiones albuminuria (relacionada con la fiebre) (Harrison, 1998)

2.6.1. Medios de Cultivo

El caldo PPLO (Pleuropneumonia-like-agent) se utiliza como medio de transporte, contiene infusión de corazón, peptona, suplemento para Micoplasmas, extracto de levaduras y suero de cobayo inactivo. Se agrega penicilina, polimixina B y anfotericina B para inhibir las bacterias gram positivas, gram negativas y hongos, respectivamente. Las muestras deben trasladarse al laboratorio de inmediato y pueden mantenerse a 4° C antes de inocular los medios de cultivo (Koneman, 1999)

El medio que se aconseja para aislar *M. pneumoniae*, se denomina medio bifásico con azul de metileno y glucosa. Este medio contiene caldo y agar PPLO, junto con glucosa, azul de metileno y fenol (Koneman, 1999).

En los cultivos el crecimiento del *M. pneumoniae* se detecta por la capacidad de estos microorganismos de producir ácido a partir de glucosa. Los cultivos se inspeccionan diariamente para detectar cambios de color y turbidez durante cuatro semanas. La turbidez macroscópica y un cambio ácido o alcalino del indicador, se debe a contaminación bacteriana. Un cambio gradual leve del indicador del pH, sin turbidez macroscópica sugiere un cultivo positivo. Cuando los cambios de color son evidentes el caldo debe subcultivarse en un medio sólido apropiado (Koneman, 1999).

2.6.2. Coloración “ Naranja de Acridina

El Naranja de Acridina es un colorante fluorocromático, el cual se une a los ácidos nucleicos de la bacteria y otras células, permitiendo la observación bajo los rayos de luz ultravioleta. Esta es una técnica que es altamente específica y por tal razón ha podido ser aplicada en la identificación de *Mycoplasmas*, observándose como un punto pequeño de color naranja en contraste con un fondo verde oscuro (Rosendal, 1981).

2.6.3. Prueba de Hemadsorción

Microorganismos como virus y *M. pneumoniae* contienen componentes de superficie capaces de aglutinar los eritrocitos de diferentes especies de animales. Cuando se evidencia desarrollo de colonias en el medio bifásico de muestras provenientes del tracto respiratorio, se adiciona una suspensión de

eritrocitos de cobayo al 5% sobre la superficie del Agar luego se incuba a 4°C durante una hora rotándolo ocasionalmente para evitar que se sedimenten los glóbulos rojos, se lava la superficie tres veces con caldo PPLO para Mycoplasma. Finalmente las colonias de *M. pneumoniae* se observa con estereoscopio en un aumento de 50 X en busca de adherencia de los eritrocitos a la monocapa (aparecen como colonias redondas cubiertas de eritrocitos formando rosetas). Este procedimiento funciona mejor sobre colonias jóvenes, porque las colonias más viejas tienden a perder su propiedad de hemadsorción. Entre los micoplasmas respiratorios, *M. pneumoniae* es la única especie que adsorbe eritrocitos (Koneman, 1999).

2.6.4. Reducción del Tetrazolio

Enzimas asociadas a la membrana celular del *M. pneumoniae*, pueden reducir el compuesto cloruro de 2 – (p – yodofenil) – 3 – nitrofenil – 5 fenil tetrazolio a formazán, compuesto rojo insoluble que precipita en las células y hace que las colonias tomen un color rojo a negro purpúreo por exposición prolongada al substrato. Esta prueba se realiza a las colonias al obtener el resultado de la hemadsorción; se realiza lavados con caldo PPLO para Micoplasmas con el fin de retirar los glóbulos rojos adheridos en la prueba anterior, esto se evalúa microscópicamente. Se agrega reactivo de tetrazolio, se incuba a 35°C durante 60 minutos y luego se observa con estereoscopio en aumento de 50x (Koneman, 1999)

2.6.5. Inmunofluorescencia Directa

Esta técnica brinda una alternativa para detectar antígenos, ayudando a establecer el diagnóstico de enfermedades bacterianas. El Anticuerpo específico se conjuga con compuestos fluorescentes, el antisuero conjugado se agrega a las células sobre un portaobjeto y se fija a los antígenos, formando un complejo inmune estable. Finalmente se observan por medio de un microscopio de fluorescencia los Antígenos específicamente unidos a los anticuerpos fluorescentes (verde manzana brillante contra un fondo oscuro) (Ridascreen Micoplasma IFA).

2.6.6. Pruebas serológicas

2.6.6.1. Fijación del Complemento

Los títulos de anticuerpos fijadores de complemento son diagnósticos cuando se cuadruplican. El título inicial mayor de 1/64 es indicadores de infección por *Mycoplasma pneumoniae*. Este incremento de los anticuerpos IgM se suscita alrededor del día 10 luego de la infección con máxima expresión al cabo de 4 – 6 semanas (Tintinalli, 1998).

2.6.6.2 Crioaglutininas

Títulos mayores o iguales a 1:64 son sugestivos de infección por *Mycoplasma*. Esta prueba tiene una sensibilidad del 50% durante la enfermedad, y usualmente es positiva en los pacientes que presentan enfermedad más severa. En el laboratorio el test de aglutinación en frío

consiste en combinar el suero del paciente y eritrocitos de tipo O (para evitar incompatibilidad A-B), la mezcla se incuba a 4° C durante varias horas y se observa la presencia o la ausencia de hemaglutinación. Si hay agrupamiento de eritrocitos, el suero del paciente se diluye en forma seriada y se repite la prueba (Smit, 1986)

Otras infecciones incluyendo influenza, mononucleosis, psittacosis, rubeola y adenovirus se han asociado a test positivos (Tintinalli, 1998). La respuesta de crioaglutininas no es específica de *M. pneumoniae* y se detecta en menos del 50% de los casos (Smit, 1986)

2.6.6.3. Inmunofluorescencia Indirecta y ELISA

Estas técnicas se han desarrollado para detectar anticuerpos IgM e IgG contra el *M. pneumoniae*. El ELISA usa la proteína de adhesión P1 como antígeno, últimamente para hacer al test más sensible y específico, y es más eficiente que la fijación del complemento (Koneman, 1999).

2.6.7. PCR (Reacción en la Cadena de la Polimerasa)

Debido a la dificultad para recuperar algunas especies de género *Mycoplasma* en cultivos y muestras directas de tracto respiratorio, se han desarrollado ensayos altamente sensibles y específicos como la PCR, utilizando secuencias de nucleótidos de genes como el blanco para la amplificación y la detección. (Koneman, 1999)

2.7. TRATAMIENTO

El tratamiento de esta entidad se establece por dos protocolos: el primero un tratamiento de soporte en el cual se utilizan: antipiréticos, oxígeno, soporte nutricional y cuidados generales (Delgadillo, 1993). En general los pacientes adolescentes y niños requieren de la limitación de la actividad física inicialmente y aunque su manejo es ambulatorio, es importante estar alerta y avisar a sus familiares para que estén pendientes de cualquier cambio en el paciente (Harrison, 1998)

El segundo controvertido para unos y pilar fundamental del tratamiento para otros, es la utilización de antibióticos. El microorganismo es sensible "in vitro" a la eritromicina y a las tetraciclinas. Sin embargo la eritromicina es más activa que las tetraciclinas "in vitro", motivo por el cual es la droga de primera elección a una dosis promedio de 30 a 50 mg/kg/día durante 7-10 días (en niños) y de 2 gramos por día en adolescentes y adultos (Delgadillo, 1993)

"In vivo" se da tetraciclina y eritromicina no eliminan los gérmenes de las vías aéreas, ni reducen la presencia de microorganismos en las secreciones corporales y tienen resistencia cruzada con aminoglicosidos. Otros estudios han reportado que no existe diferencia significativa con la utilización de antibióticos en cuanto a la duración de la tos, la estancia hospitalaria o la resolución radiográfica (Delgadillo, 1993).

La profilaxis con oxitetraciclina ha demostrado ser efectiva para la prevención de neumonía por *M. pneumoniae* dentro de la familia del paciente (Delgadillo, 1993)

3. JUSTIFICACIÓN

La infección respiratoria aguda es una de las causas de morbi-mortalidad en el país y en el mundo; dentro de los agentes etiológicos de esta entidad se encuentra el *Mycoplasma pneumoniae*, patógeno de los seres humanos, que produce principalmente neumonía atípica, en lactantes y niños pequeños, situación que dificulta en ocasiones el diagnóstico y por ende el manejo de la misma (Delgadillo, 1993).

La infección por *Mycoplasma pneumoniae* es cosmopolita, aunque la mayoría de los casos se han documentado en climas templados, sin predominio estacional. Las epidemias por este microorganismo se han presentado tanto en la población civiles como militares. El período epidémico se ha presentado de inicio lento y duración prolongada (2 años o mas) en niños y adultos jóvenes. La frecuencia de la neumonía por *Mycoplasma* varía de acuerdo con la población estudiada y puede ir desde un 4% en población abierta, hasta el 25-75% en poblaciones cerradas (guarderías, internados, instituciones militares, reformatorios entre otras) (Delgadillo, 1993).

En cuanto a la transmisión, ésta se realiza a través de niños escolares, quienes transmiten el microorganismo a sus familias, al parecer por contacto persona a persona y por partículas pequeñas de aerosol. (Harrison, 1998)

En Colombia no se realiza un diagnóstico específico para *M. pneumoniae*. El cuadro clínico que presenta el paciente es manejado por el médico de acuerdo con su sintomatología (tos, rinorrea, fiebre, dolor pleural), esto refiere una enfermedad de vías respiratorias, lo que favorece el tratamiento inicial que esta basado en β - lactámicos y si no se observa una recuperación, el médico piensa que la enfermedad puede ser causada por *M. pneumoniae*.

Aunque el fenómeno de aglutinación en frío no es exclusivo de los pacientes con neumonía por micoplasmas y aun cuando muchos enfermos con este tipo de neumonía nunca desarrollan crioaglutininas, esta técnica ha seguido siendo la más utilizada para diagnosticar la enfermedad (Smit, 1986)

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

3 Determinar la prevalencia de *Mycoplasma pneumoniae* en la población pediátrica (1 a 4 años de edad) con neumonía de la Clínica del Niño.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3 Identificar presuntivamente por medio de la coloración de naranja de acridina, la presencia de *Mycoplasma pneumoniae*.

3 Determinar *Mycoplasma pneumoniae* por medio de cultivos y pruebas específicas como hemoadsorción, reducción de tetrazolio e Inmunofluorescencia directa.

3 Establecer la distribución de frecuencia de los resultados de Rayos X de Torax, títulos de Crioalgotininas, Cuadro Hemático y demás variables del estudio en los pacientes con diagnóstico positivo para *Mycoplasma pneumoniae*.

5. METODOLOGÍA

5.1. TIPO DE ESTUDIO

Para el desarrollo del trabajo de Investigación “Determinación de la prevalencia de *Mycoplasma pneumoniae* en la población pediátrica con neumonía de la Clínica del Niño” se realizó un análisis estadístico de tipo descriptivo con direccionalidad prospectiva y temporalidad transversal; los resultados se presentaron a través de distribuciones de frecuencia.

5.2. POBLACIÓN PARA EL MUESTREO

Todo niño entre 1 y 4 años de edad que ingresó a la Clínica del Niño con signos y síntomas compatibles con diagnóstico de neumonía y/o bronconeumonía.

5.2.1. Criterios de inclusión

Niños entre 1 y 4 años de edad que ingresaron a la Clínica del Niño por Urgencias al servicio de Hospitalización con los siguientes signos y síntomas

de Neumonía de 7 a 15 días de evolución y menos de 24 horas de estancia en este servicio:

- Aumento de la frecuencia respiratoria : El valor normal en niños de 1 a 4 años de edad es de 40 respiraciones por minuto
- Síndrome de dificultad respiratoria

Taquipnea : Aceleración anormal de la frecuencia respiratoria.

Cianosis : Coloración azulada de la piel y las membranas mucosas debida al exceso de hemoglobina no oxigenada o a un defecto estructural de la molécula de hemoglobina.

Tirajes intercostales : Aumento del trabajo respiratorio, debido al síndrome de dificultad respiratoria.

- Fiebre : Mayor de 38° C
- Tos

5.2.2. Criterios de exclusión

Pacientes con diagnóstico de Bronquiolitis (infección vírica aguda de las vías respiratorias inferiores que afecta sobre todo a lactantes de dos a doce meses de edad y que se caracteriza por sibilancias y obstrucción bronquiolar), bronco obstrucción (disminución del tamaño de bronquio que dificulta la entrada y salida de aire hacia los pulmones), asma (Trastorno respiratorio caracterizado por estrechamiento bronquial contráctil, inflamatorio y edematoso que origina episodios de disnea, sibilancias, tos y secreciones bronquiales mucosas viscosas) y pacientes que presenten

sibilancias (Forma de roncus caracterizada por un tono musical agudo. Se produce al pasar aire a una velocidad elevada a través de una vía estrecha).

5.3. MUESTRA

Se tomaron hisopados nasales (112/112) y muestra de sangre (91/112) a pacientes de la Clínica del Niño que ingresaron con diagnóstico de neumonía.

A cada paciente se le tomaron dos hisopados, con el primero se realizó la lámina para coloración Naranja de Acridina (Anexo 1) y se sembró en caldo PPLO (Anexo 2) y con el segundo hisopo se realizó el cultivo en un medio bifásico azul de metileno-glucosa (Anexo 3) . (Koneman, 1999)

5.4. MEDIOS DE CULTIVO

54.1. Caldo PPLO

Los caldos PPLO inoculados, se incubaron a 35° C de 10-15 días y se observaron diariamente para valorar la presencia de *Mycoplasma*, el cual produjo viraje del color en el medio al fermentar la glucosa, provocando el viraje del indicador (rojo de fenol) de color verde a amarillo. (Koneman, 1999)

5.4.2. Medio Bifásico Azul de Metileno-Glucosa

La muestra tomada con hisopos fue sembrada en el medio bifásico azul de metileno-glucosa, incubada a 35° C de 10 – 15 días y observada diariamente para valorar el viraje de color en la fase líquida. En presencia de *Mycoplasma*

se produce viraje de color debido a que la bacteria metaboliza glucosa y hace que vire el indicador de pH (rojo de fenol), de color salmón y/o color amarillo, evidenciándose así el crecimiento. Al mismo tiempo, los microorganismos reducen el azul de metileno y lo llevan de azul a incoloro. (Koneman, 1999)

5.5. PRUEBA DE ORIENTACIÓN

5.5.1. TEST – SPOT Coloración Naranja de Acridina

Se utilizaron láminas multipozos (Ref. Glass 8-multitest Slide) sobre las que se depositó la muestra directa de hisopado nasal y de los medios bifásicos positivos; las muestras se fijaron durante un minuto con metanol dejando escurrir el exceso y evaporar a temperatura ambiente (Rosendal, 1981). Se agregó una gota del colorante naranja de acridina en cada pozo, se dejó actuar durante 30 minutos y se realizaron varios lavados con agua destilada por 30 minutos. Finalmente, se observó en el microscopio de fluorescencia usando el objetivo de 100x.

5.6. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN

5.6.1. Resiembra

Cuando se evidenció desarrollo de Micoplasmas en el medio bifásico de muestras provenientes del tracto respiratorio, se realizó una nueva siembra en medio agar modificado para Mycoplasma (Anexo 4) y se incubó durante 10 días a 35° C.

5.6.2. Prueba de Hemadsorción

Luego del crecimiento de las bacterias en el medio agar modificado para *Mycoplasma*, se adicionó una suspensión de eritrocitos de cobayo al 5% (2 mL) sobre la superficie del agar, se dejó incubar a 4°C durante una hora rotándolo ocasionalmente para evitar que se sedimentaran los glóbulos rojos y se lavó la superficie tres veces con caldo PPLO para *Mycoplasma* (Anexo 5). Finalmente las colonias de *M. pneumoniae* se observaron con estereoscopio en un aumento de 50 X, en busca de eritrocitos adheridos sobre las colonias típicas de *Mycoplasma*. (Koneman, 1999)

5.6.3. Reducción de Tetrazolio

Con base a la utilización de enzimas asociadas a la membrana celular del *M. pneumoniae*, se pudo evaluar la reducción del compuesto cloruro de 2 – (p – yodofenil) – 3 – Nitrofenil – 5 fenil tetrazolio a formazán, compuesto rojo insoluble que se precipita en las células.

Esta prueba se realizó al obtener el resultado de la Prueba de Hemadsorción; para ello se realizaron tres lavados con caldo PPLO para Mycoplasmas para retirar los glóbulos rojos adheridos en la prueba anterior y se golpeó la caja para soltarlos. Se agregaron 2 ml del reactivo de tetrazolio (Anexo 6), se incubó a 35° C durante 60 minutos y luego se observó con esteroscopio en aumento de 50 X. (Koneman, 1999)

5.6.4. Prueba de Inmunofluorescencia Directa (Mycoplasma IFA Ridascreen)

Cuando se evidenció desarrollo de colonias en el medio bifásico de las muestras provenientes del tracto respiratorio, se tomó una muestra de la fase líquida que contenía la bacteria, con un asa estéril se colocó en una lámina, se secó a temperatura ambiente, se fijó durante un minuto con metanol, se dejó escurrir el exceso y se permitió su secado al aire. Se colocó una gota del Anticuerpo IgM monoclonal anti *Mycoplasma pneumoniae* (Reactivo No. 1) durante treinta minutos en cámara húmeda, se lavó con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente, luego se colocó una gota del Anticuerpo IgG anti-anti *Mycoplasma pneumoniae* obtenido de ratón marcados con fluoresceína (Reactivo No. 2) durante treinta minutos en cámara húmeda, se lavó con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente, para finalmente observarse en el microscopio de Fluorescencia usando el aumento de 100X con aceite de inmersión (Anexo 7).

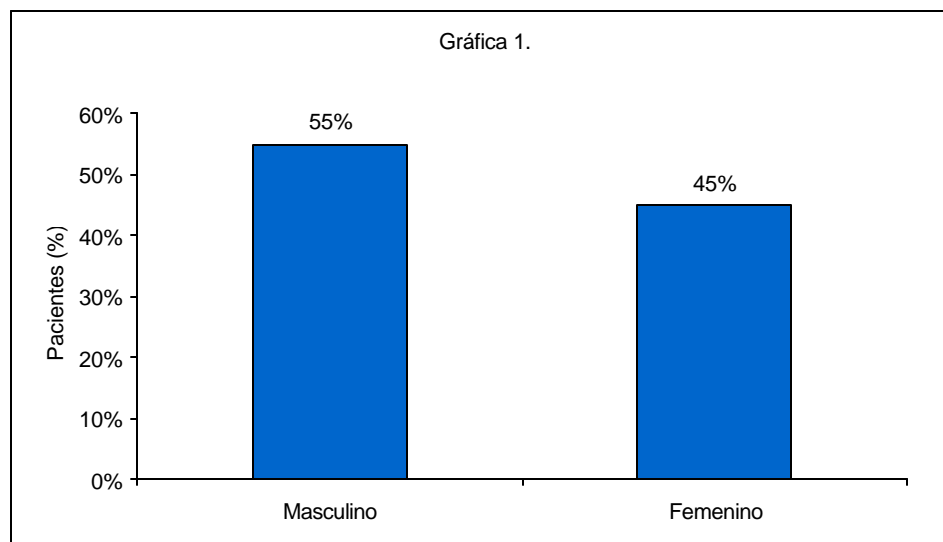
5.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el programa Stat View 4.0 para realizar el análisis de datos de las diferentes variables que se tuvieron en cuenta dentro del estudio.

6. RESULTADOS

De los 112 pacientes pediátricos que ingresaron a la Clínica del Niño por el Servicio de Urgencias que fueron hospitalizados por diagnóstico de Neumonía y Bronconeumonía, cumpliendo con los siguientes criterios de inclusión : edad entre 1 - 4 años, aumento de la frecuencia respiratoria (> de 40 respiraciones por minuto), Síndrome de dificultad respiratoria (taquipnea, cianosis y/o tirajes intercostales), fiebre y tos; se pudo observar la siguiente distribución de frecuencia por sexo (gráfica 1).

Gráfica 1. Distribución de frecuencia por género de 112 pacientes que ingresaron a la Clínica del Niño con diagnóstico de Neumonía y Bronconeumonía



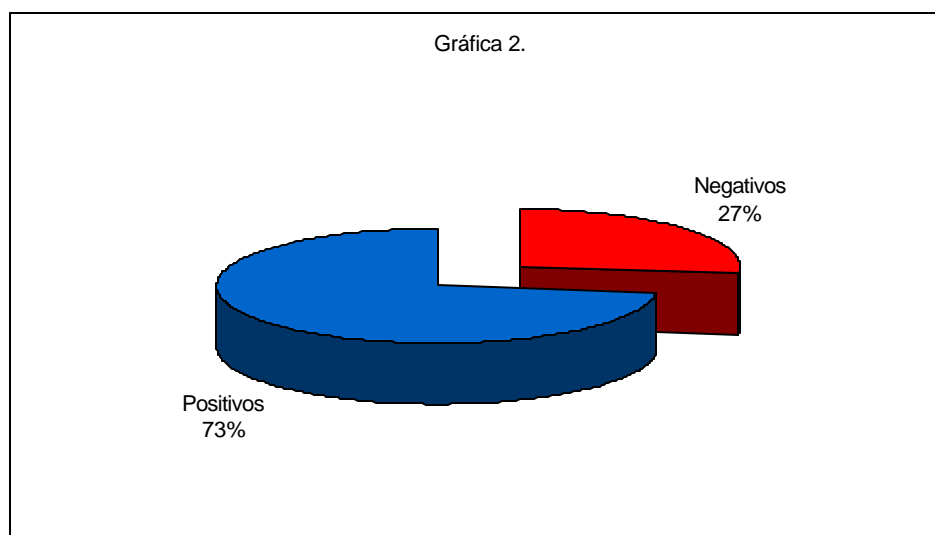
En la tabla 1 se presenta la distribución de frecuencia por edad y género de la totalidad de los pacientes que ingresaron en el estudio de prevalencia de *Mycoplasma pneumoniae*.

Tabla 1. Relación por edad y género de 112 pacientes que ingresaron a la Clínica del Niño con diagnóstico de Neumonía y Bronconeumonía

Edad	1 – 2 años	2 – 3 años	3 – 4 años	4 años	Totales
Género					
Femenino	26	7	13	4	50
Masculino	33	18	8	3	62
Totales	59	25	21	7	112

Por medio de los cultivos de hisopado nasal y pruebas confirmatorias para *Mycoplasma pneumoniae* realizadas a las muestras provenientes del tracto respiratorio de los 112 niños que acudieron a la Clínica de Niño y que fueron Hospitalizados por diagnóstico de neumonía y bronconeumonía, se pudo evidenciar la presencia de *Mycoplasma pneumoniae* resultados que se pueden observar en la gráfica 2.

Gráfica 2. Porcentaje de pacientes positivos para *Mycoplasma pneumoniae*



Las figuras de la 1 a la 5 representan los cultivos y las pruebas confirmatorias que se usaron para el diagnóstico de *Mycoplasma pneumoniae*.



A. Viraje de color en medio Bifásico.



B. Viraje de color en el Caldo PPLO.

Figura 1. Medios de Cultivo



Figura 2. Colonia característica de *M. pneumoniae* en forma de huevo frito vista en aumento de 50X

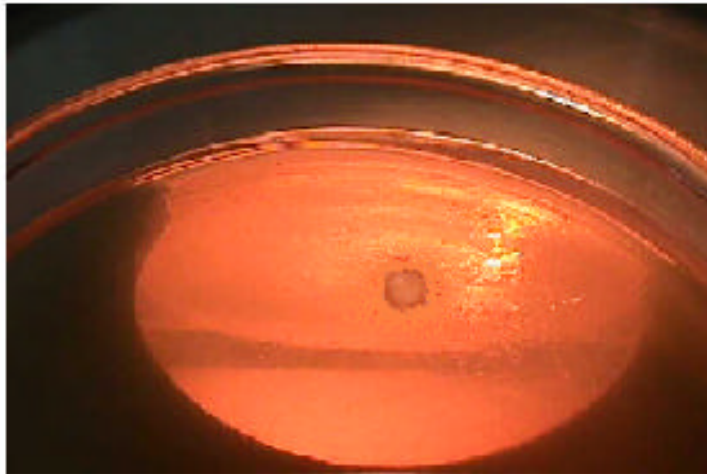
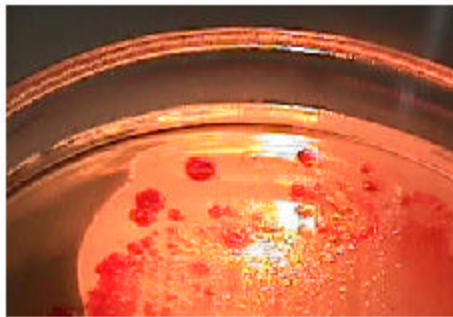


Figura 3 . Prueba de Hemadsorción positiva para *Mycoplasma pneumoniae* vista en aumento de 50X

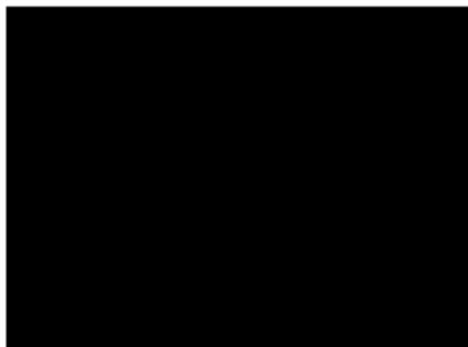


A. Prueba positiva

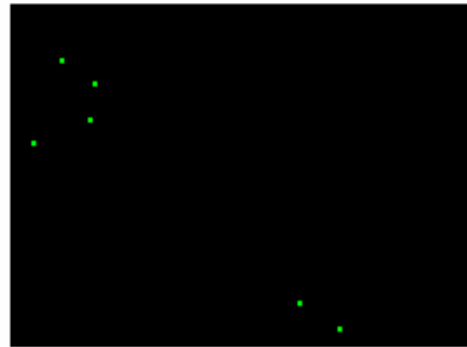


B. Prueba negativa

Figura 4. Reducción de Tetrazolio



A. Prueba negativa

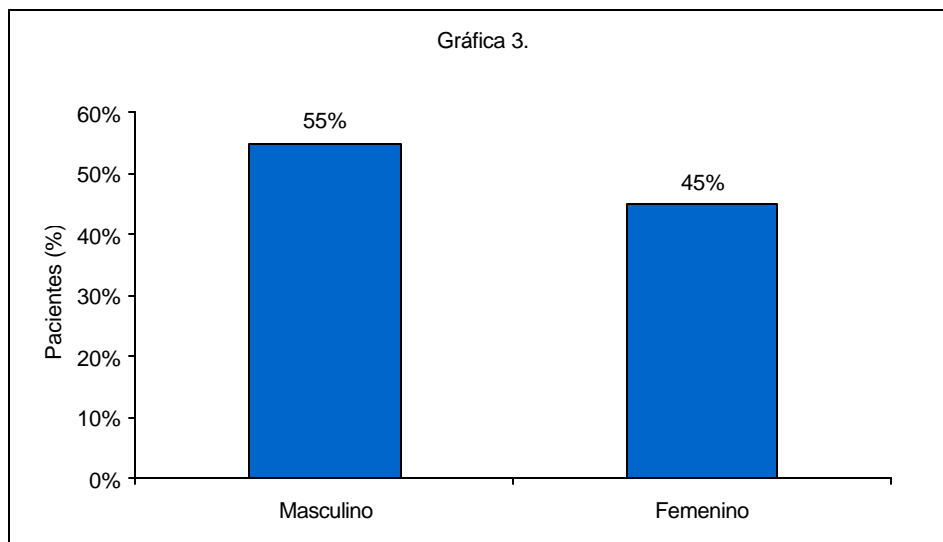


B. Prueba positiva

Figura 5. Inmunofluorescencia directa para *M. pneumoniae* vista en aumento de 100X

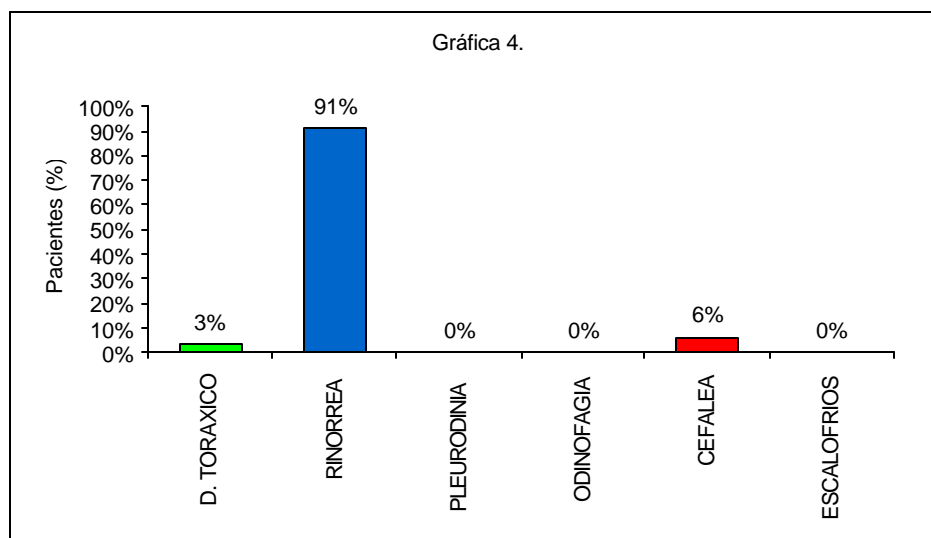
En la gráfica 3 se presenta la distribución de frecuencia por género de los pacientes a los cuales se les identificó *Mycoplasma pneumoniae*.

Gráfica 3. Distribución de frecuencia por género de los pacientes con diagnóstico positivo para *Mycoplasma pneumoniae*



La gráfica 4 presenta la distribución de frecuencia de las variables que se tuvieron en cuenta dentro del estudio como dolor torácico, rinorrea, pleurodinia, odinofagia, cefalea y escalofríos, en los pacientes con diagnóstico positivo para *Mycoplasma pneumoniae*.

Gráfica 4. Distribución de frecuencia de las variables presentes en los pacientes con diagnóstico positivo para *M. pneumoniae*



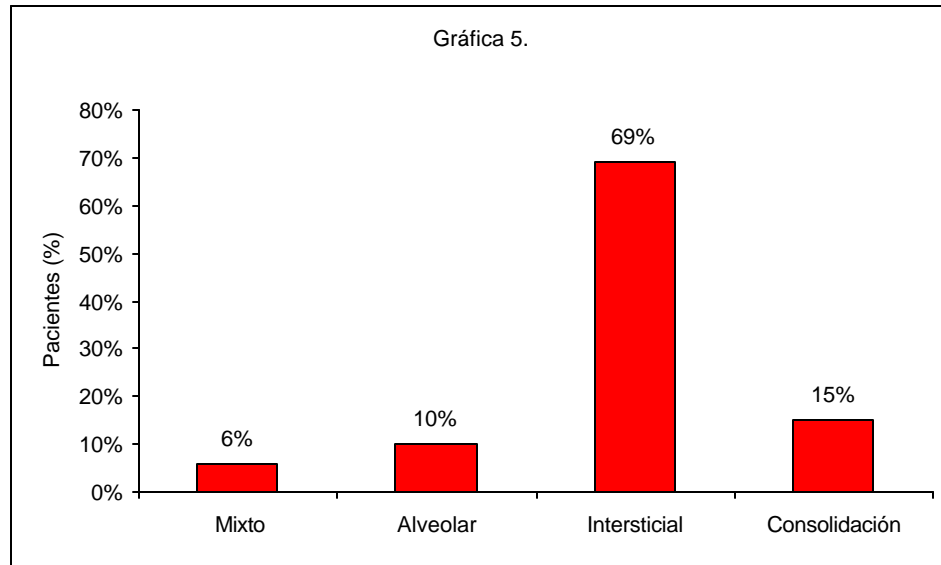
En la tabla 2 se presenta la distribución de frecuencia de las variables que se tuvieron en cuenta en la totalidad de los pacientes que ingresaron al estudio.

Tabla 2. Distribución de frecuencia de las variables del estudio en los 112 pacientes que ingresaron a la Clínica del Niño con diagnóstico de neumonía y bronconeumonía

VARIABLES	Pacientes positivos para <i>M. pneumoniae</i>	Pacientes negativos para <i>M. pneumoniae</i>
Dolor torácico	3%	4%
Rinorrea	91%	70%
Pleurodinia	0%	0%
Odinofagia	0%	9%
Cefalea	6%	17%
Escalofríos	0%	0%

En la siguiente gráfica se presentan los resultados radiológicos de los pacientes que fueron positivos para la presencia de *Mycoplasma pneumoniae*.

Gráfica 5. Distribución de frecuencia del resultado Radiológico presente en los pacientes con diagnóstico positivo para *M. pneumoniae*.



La figura 6 muestra el patrón radiológico que se presentó con mayor frecuencia en los niños con diagnóstico positivo para *M. pneumoniae*.

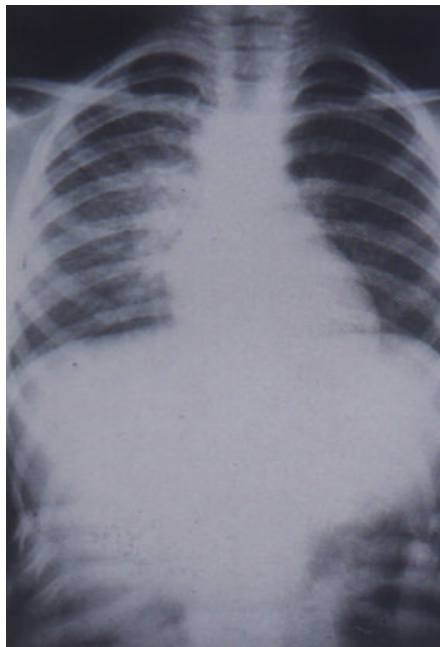


Figura 6. Neumonía por *Mycoplasma pneumoniae* con infiltrado pulmonar derecho.

A continuación se presentan los valores de referencia para Cuadro Hemático que se tuvieron en cuenta para la población pediátrica que participó en este estudio.

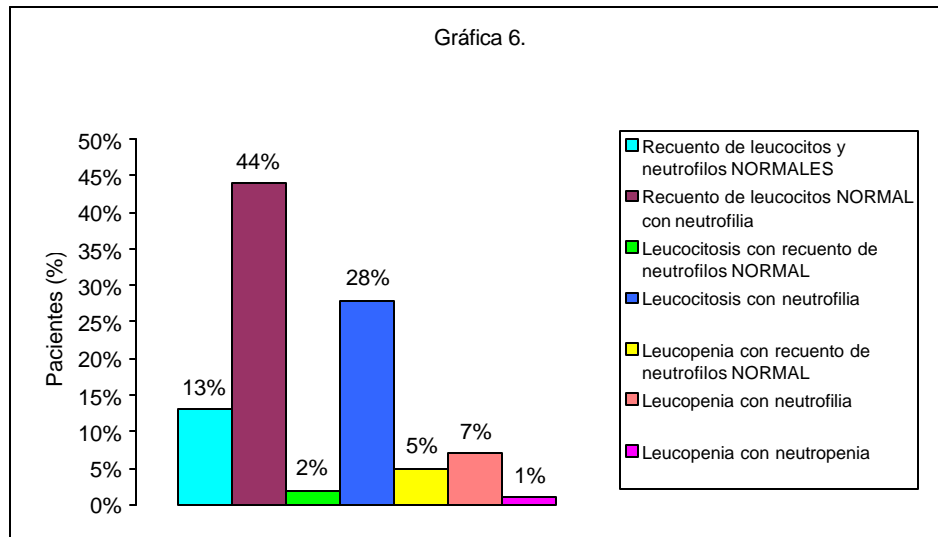
Tabla 3. Valores de Referencia Cuadro Hemático

Edad (años)	Leucocitos Totales (mm ³)	Neutrófilos (%)
1 a 2	6.000 – 18.000	28
2 a 4	6.000 – 16.000	40

* Vives., J. Manual de técnicas de Laboratorio en Hematología. 1998

Con base en los valores de referencia del Cuadro Hemático se establecieron los siguientes resultados para los pacientes con diagnóstico positivo para *M. pneumoniae*.

Gráfica 6. Distribución de frecuencia del resultado del Cuadro Hemático en los pacientes con diagnóstico positivo para *M. pneumoniae*



En la siguiente tabla se describe la relación entre los títulos de crioaglutininas y la presencia de *Mycoplasma pneumoniae*.

Tabla 4. Relación entre el diagnóstico positivo de *M. pneumoniae* y los títulos de Crioaglutininas.

	Título de Crioaglutininas	No. pacientes
Títulos NO Significativos Para <i>Mycoplasma pneumoniae</i> *	Negativo	11
	1/2 Dils	10
	1/4 Dils	14
	1/8 Dils	6
	1/16 Dils	11
Títulos significativos para <i>Mycoplasma Pneumoniae</i> **	1/32 Dils	7
	1/64 Dils	7
	1/256 Dils	2
	1/512 Dils	1
	1/1024 Dils	1

* Títulos \leq a 1/32 Dils

** Títulos \geq a 1/64 Dils

La figura 7 muestra la cuantificación de títulos de crioaglutininas realizada a 91 de los pacientes con diagnóstico de Neumonía y Bronconeumonía.

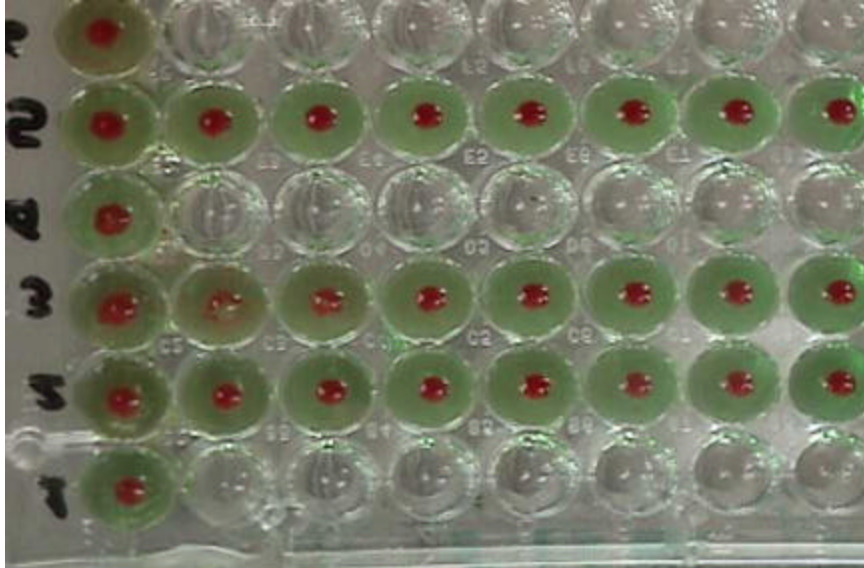


Figura 7. Crioaglutininas

La sensibilidad y especificidad de las crioaglutininas fue determinada por medio de tablas de contingencia de 2x2 usando como Prueba de Oro el cultivo.

Tabla 5. Relación entre el diagnóstico de *M. pneumoniae* usando como Prueba de Oro el Medio Bifásico.

		Medio Bifásico		
		POSITIVO	NEGATIVO	Totales
Crioaglutininas	POSITIVO	11	1	12
	NEGATIVO	59	20	79
Totales		70	21	91

$$\text{SENSIBILIDAD} = \frac{11}{69} \times 100 = 15.9\%$$

$$\text{ESPECIFICIDAD} = \frac{21}{22} \times 100 = 95.4\%$$

La utilidad del TEST – SPOT Naranja de Acridina en el diagnóstico de *Mycoplasma pneumoniae* a partir de muestras directas de tracto respiratorio se representa mediante la determinación de sensibilidad y especificidad.

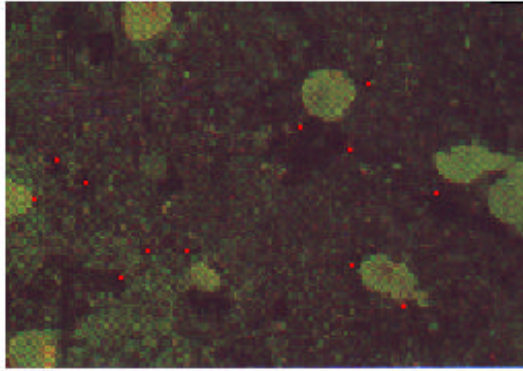
Tabla 6. Relación entre el Medio Bifásico con el TEST – SPOT Coloración Naranja de Acridina.

		Medio Bifásico		
		POSITIVO	NEGATIVO	Totales
Naranja de Acridina	POSITIVO	82	0	82
	NEGATIVO	0	30	30
Totales		82	30	112

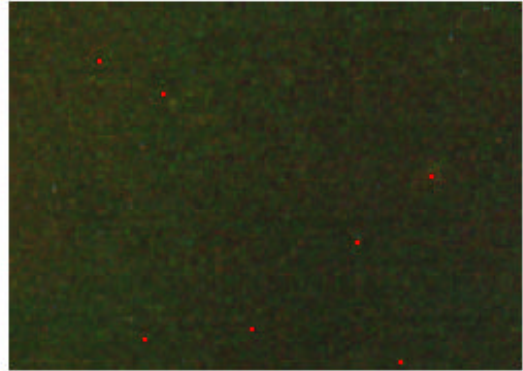
$$\text{SENSIBILIDAD} = \frac{82}{82} \times 100 = 100\%$$

$$\text{ESPECIFICIDAD} = \frac{30}{30} \times 100 = 100\%$$

En la figura 8 se observa la presencia de *Mycoplasma pneumoniae* coloreado con Naranja de Acridina y observado al microscopio de fluorescencia usando el objetivo 100X.



A. Muestra Directa



B. Muestra de Cultivo

Figura 8. TEST – SPOT Coloración Naranja de Acridina vista en aumento de 100X

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Este trabajo forma parte de una línea de Investigación del Laboratorio de Microbiología Especializada de la Pontificia Universidad Javeriana, que busca el diagnóstico de *Mycoplasma pneumoniae* en Colombia, mediante la implementación de pruebas rápidas, económicas y sensibles como el TEST-SPOT coloración Naranja de Acridina.

En la actualidad el diagnóstico de la neumonía causada por *M. pneumoniae* es manejado por el médico de acuerdo a la sintomatología del paciente, dejando a un lado la parte del laboratorio. La identificación microbiológica no se ha implementado debido a que *Mycoplasma pneumoniae*, no es fácil de identificar por su ausencia de pared, lo que hace imposible su observación mediante la coloración de Gram, además no es cultivable en medios comunes como agar Sangre o agar Chocolate ya que este microorganismo necesita de nutrientes especiales para su crecimiento y mantenimiento.

Se estudiaron 112 pacientes entre 1 y 4 años de edad que ingresaron a la Clínica del Niño con diagnóstico de Neumonía y Bronconeumonía, de los cuales el 73% fue positivo para *M. pneumoniae* y el 27% negativo (gráfica 2), encontrándose que la mayor incidencia de este microorganismo se presenta en niños de 1 año de edad. Estos datos difieren en comparación con el estudio de Martínez (1993) en el Hospital la Misericordia en el que se incluyeron 48 pacientes entre 2 y 15 años de edad con diagnóstico de neumonía y bronconeumonía donde la tasa de incidencia fue del 13%, determinada mediante estudios microbiológicos.

Sin embargo en una investigación realizada por Brunner (1976) se determinó una prevalencia de neumonía por *Mycoplasma* del 67% en pacientes de 2 a 5 años de edad (Delgadillo, 1990).

De los pacientes que fueron positivos para *Mycoplasma pneumoniae*, el 45% pertenecen al género femenino y el 55% al género masculino (gráfica 3). Estos se encuentran dentro de rangos similares a los reportados en el estudio realizado por Delgadillo (1993) donde se estableció que en la distribución en cuanto a género en una muestra de 46 pacientes, el 41.3% eran niñas y el 56.6% eran niños.

Los cultivos de muestras nasales establecen que el viraje y la turbidez macroscópica de los medios se dá entre 1 y 5 días por contaminación bacteriana generalmente y de 8 a 15 días en el caso de *Mycoplasma*

pneumoniae (Koneman, 1999). En acuerdo a lo anterior los cultivos viraron entre el 10º y 15º día de incubación (figura 1) y tan sólo un 7% de los Caldos PPLO presentaron contaminación bacteriana, este porcentaje fue bajo ya que a los medios se le adicionó suplemento comercial para *Mycoplasma* marca OXOID, el cual contiene nutrientes especiales como son : extracto de levadura al 25%, agentes antibacterianos como acetato de talio, penicilina y azul de metileno, que impiden el sobrecrecimiento por parte de los microorganismos contaminantes de tracto respiratorio e inhiben a los Micoplasmas de crecimiento lento.

Un cambio gradual leve del indicador de pH de 8 a 15 días, sin turbidez macroscópica sugiere un verdadero cultivo positivo. Durante el crecimiento de *Mycoplasma pneumoniae* el medio se torna más ácido y el rojo de fenol vira de salmón y/o a amarillo. Al mismo tiempo, los microorganismos reducen el azul de metileno y lo llevan de azul a incoloro.

Según estudios previos realizados en la Universidad Javeriana se comprobó la utilidad de la hemadsorción (figura 3) como prueba de identificación presuntiva para *Mycoplasma pneumoniae*, al adsorber glóbulos rojos, contrario a otros microorganismos como *Streptococcus pneumoniae* que no presentan esta característica (Bermúdez, 2000), en acuerdo con lo anterior en el presente estudio se logró un 100% de positividad usando esta técnica.

En la reducción de tetrazolio (figura 4) se analiza la capacidad de *Mycoplasma pneumoniae* para reducir el tetrazolio al compuesto formazán de color rojo. Esto permite identificar con certeza el microorganismo, ya que este compuesto no actúa en bacterias con pared al no lograr un contacto directo con la membrana. Los resultados obtenidos para esta prueba corresponden a un 100% de especificidad y sensibilidad para *Mycoplasma pneumoniae*, teniendo como ventaja su rápida y fácil interpretación en el laboratorio.

Al realizar la Inmunofluorescencia Directa en el presente estudio, en la que se trabajó con anticuerpos monoclonales IgM contra *Mycoplasma pneumoniae*, donde se observó el microorganismo como un punto verde fluorescente en contraste con un fondo negro, se obtuvo un 100% de positividad, debido a que estos anticuerpos son específicos.

Las variables que se tuvieron en cuenta dentro del estudio como : dolor torácico, rinorrea, pleurodinia, odinofagia, cefalea y escalofríos no presentaron relación entre la presencia de *Mycoplasma pneumoniae*, sin embargo la rinorrea (gráfica 4) prevaleció en los pacientes con diagnóstico positivo (91%) y negativo (70%) (tabla 2), lo que indica que este síntoma no

es específico para este microorganismo y además puede presentarse en otras infecciones como: Virus Sincitial Respiratorio, Influenza, entre otros (Restrepo, 1998).

En las Radiografías de Tórax los hallazgos son compatibles con una bronconeumonía difusa, que en general involucra a múltiples lóbulos del pulmón, sin consolidación (Koneman, 1999). Los patrones radiográficos observados en la neumonía por *Mycoplasma pneumoniae* variaron ampliamente, mostrando infiltrados de tipo alveolar, intersticial y mixto; prevaleciendo en un 69% el infiltrado de tipo intersticial (figura 6).

De los pacientes con diagnóstico positivo para *Mycoplasma* un 85% presentó infiltrados y tan solo un 15% mostró condensación pulmonar, datos que se hallan en desacuerdo con el estudio realizado por Delgadillo (1993), en donde el principal hallazgo fue la presencia de condensación en un 62.8%.

En este estudio el tipo de infiltrado que se presentó en mayor porcentaje fue el intersticial, resultados que se encuentran en acuerdo con Harrison (1998) quien revela que los enfermos con neumonía por *Mycoplasma pneumoniae* presentan en su mayoría infiltrados reticulonodulares difusos o intersticiales, casi siempre localizados en los lóbulos inferiores.

La prueba convencional de laboratorio como el Cuadro Hemático suele ofrecer recuentos de leucocitos y neutrofilos normales o ligeramente aumentados en los pacientes con diagnóstico de neumonía atípica (Harrison, 1998). En acuerdo con lo enunciado anteriormente, los resultados de este estudio indican que el mayor porcentaje (44%) de los pacientes con diagnóstico positivo para *Mycoplasma pneumoniae* presentaron recuento de leucocitos normales con neutrofilia, esto significa que no es un buen marcador (gráfica 6).

Las crioaglutininas son anticuerpos de tipo IgM que se unen al Antígeno I de los eritrocitos por reacción antigénica cruzada entre el *Mycoplasma* y la membrana de los hematíes. Estas suben rápidamente en presencia del microorganismo llegando al máximo a las tres o cuatro semanas del comienzo de la enfermedad con títulos positivos mayores de 1/64 dil (Smit, 1986). En contraste con lo anterior los resultados de crioaglutininas en los pacientes con diagnóstico positivo para *M. pneumoniae* de este estudio fueron negativas o presentaron títulos no significativos esto puede estar relacionado con la toma de muestra, ya que se realizó cuando los pacientes tenían un promedio de 2 semanas de evolución de la enfermedad.

Mediante tablas de contingencia de 2x2 se determinó el 15.9% de sensibilidad y el 95.4% de especificidad para las crioaglutininas (tabla 4), estos datos coinciden con la inadecuada utilización de esta prueba para el

diagnóstico de *M. pneumoniae* ya que los títulos pueden estar aumentados en trastornos infecciosos como tuberculosis, influenza, mononucleosis, adenovirus, y no infecciosos como cáncer, linfoma y trastornos del colágeno (Tintinalli, 1998).

Al realizar la coloración TEST-SPOT Naranja de Acridina a las muestras directas de hisopados nasales y a medios Bifásicos positivos para *M. pneumoniae* se estableció un 100% de sensibilidad y especificidad (tabla 6). La coloración Naranja de Acridina a pH de 3.5 - 4.0 diferencia microorganismos de materiales celulares, contribuyendo así a un excelente contraste entre la tinción de la bacteria y sobre un fondo verde. Dicha coloración confiere diferentes tonalidades a estructuras celulares cuando se prepara a pH bajo, así por ejemplo las bacterias se tiñeron de naranja brillante y fueron fácilmente diferenciadas de células humanas y restos de tejidos los cuales se tiñen de verde pálido o amarillo (Kronvall, 1977).

El TEST-SPOT Coloración Naranja de Acridina no solo tiñe *Mycoplasma pneumoniae* sino también flora bacteriana acompañante, por lo tanto se requiere que en los laboratorios en los que se implemente esta técnica para la identificación presuntiva de *Mycoplasma pneumoniae* exista personal entrenado para la visualización, la cual se facilita por la forma y el tamaño de este microorganismo.

8. CONCLUSIONES

✓ De las 112 muestras de hisopados nasales tomadas a pacientes pediátricos con diagnóstico de bronconeumonía y neumonía, el 73% (83/112) fueron positivas para *Mycoplasma pneumoniae*, sin afirmar que éste sea el agente etiológico de estas patologías ya que existen otros microorganismos concomitantes que no fueron identificados en esta investigación y que pueden ser los verdaderos causantes de la enfermedad.

✓ La alta sensibilidad del TEST-SPOT Naranja de Acridina permite recomendarla como prueba presuntiva rápida y económica en el laboratorio.

✓ En el Medio Bifásico Azul de Metileno-Glucosa se logró obtener un óptimo crecimiento y mantenimiento de la bacteria, debido a que es un medio selectivo para *Mycoplasma* que posee inhibidores como el azul de metileno, el acetato de talio, antibióticos y demás requerimientos que contienen precursores para la biosíntesis de ácido nucleicos, proteínas y lípidos.

✓ Las técnicas de Hemadsorción, Reducción de Tetrazolio e Inmufluorescencia Directa permiten la identificación de *Mycoplasma*

pneumoniae a partir del medio de cultivo, demostrando ser específicas para este microorganismo, sin generación de falsos positivos.

✓ Se comprobó que criterios clínicos y de laboratorio como reporte radiológico, Crioaglutininas y Cuadro Hemático no son recomendables para ser usadas en el diagnóstico de *Mycoplasma pneumoniae*, ya que se presentaron diferentes variables sin prevalencia estadísticamente significativa en los pacientes positivos.

✓ En Colombia actualmente no se realizan investigaciones encaminadas a la identificación de *M. pneumoniae* por esta razón el presente estudio presta gran utilidad en el diagnóstico, evaluación y tratamiento de la enfermedad respiratoria aguda proporcionando datos epidemiológicos de dicha enfermedad que permiten promover estudios posteriores en los que se identifiquen otros agentes etiológicos causantes de neumonía, pudiéndose asociar la presencia de *M. pneumoniae* con la enfermedad.

9. RECOMENDACIONES

- ✓ Implementar el TEST-SPOT Naranja de Acridina en el diagnóstico presuntivo de *Mycoplasma pneumoniae* ya que es un método, rápido, fácil, económico y sensible, que permite diferenciar este microorganismo aunque halla contaminación y flora acompañante en la muestra clínica.

- ✓ Realizar un estudio que permita identificar otros agentes etiológicos causantes de neumonías y bronconeumonías atípicas en nuestro país, determinando la distribución de frecuencia, con el fin de aportar al conocimiento epidemiológico, diagnóstico y tratamiento de dichas enfermedades.

BIBLIOGRAFIA

1. ALAN., L. Acute Pharyngitis : Etiology and Diagnosis. *Pediatrics*. 1996. 949 – 953
2. BALLOWS. A., Manual of clinical microbiology. 5ª Edición. Washington, DC. *American Society for Microbiology*. 1991. 463-470.
3. BERNARD., J Diagnostico y tratamiento clínicos por el laboratorio. 9ª. Edición. Editorial Masson – Salvat medicina. Pag.: 687, 1307, 1310.
4. CORREA., J. Fundamentos pediátricos. Enfermedades infecciosas y Respiratorias. Tomo II. Ed. CIB. 1994. 71: 787- 789.
5. DELGADILLO., M. Infección por *Mycoplasma pneumoniae* estudio en 46 pacientes pediátricos en el hospital La Victoria (Bogotá). 1993. Adquirido de: http://www.encolombia.com/infección_pediatria33-1.htm
6. DELGADILLO., M. *Mycoplasma pneumoniae*. *Pediatría*. Vol. 25 No. 2. 1990. 29 – 37.
7. DIAGAMA., O. Determinación de *Mycoplasma pneumoniae* en pacientes pediátricos del Hospital La Victoria. Pontificia Universidad Javeriana. 1999. 4 – 22
8. FOY. H. M., Long-term epidemiology of infections with *Mycoplasma pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1979. 139: 681-687.

9. GAYTON., ARTHUR. Fisiología Humana. 6ª Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. 1987. 442.
10. GEORGE., H. Etiology and treatment of pneumonia. *Pediatr Infect Dis.* 2000. Vol. 19. 4 : 373 – 377.
11. GISPERT. Carlos., Diccionario de Medicina. 4ª. Edición. Editorial Oceano. 1998. 900-903.
12. GOMEZ., Marcela. Implementación de un método para el aislamiento e identificación de *Mycoplasma pneumoniae* en el laboratorio de Microbiología Especializada de la Pontificia Universidad Javeriana.
13. HARRISON., T. Principios Medicina Interna. Volumen I. 14ª Edición. Editorial McGraw-Hill. 1998. 1205 – 1207.
14. IGUARAN., Y. Implementación del Agar PPLO para el aislamiento e identificación de *Mycoplasma pneumoniae* en el laboratorio de Microbiología Especializada de la Pontificia Universidad Javeriana. Pontificia Universidad Javeriana. 2000. 2 – 23.
15. KENNY., G. Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia : Sensitivities and specificities of serology with lipid and isolation of the organism on soy peptone medium for identification of infections. *Journal and clinical Microbiology.* Septiembre 1990. Vol. 28 9 : 2087 – 2091.
16. KONEMAN., Elmer. Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas Color. 3ª. Edición. Editorial Medica Panamericana. 1999. 121, 160, 164.

17. KRAUSE., D. Identification of *Mycoplasma pneumoniae* Proteins Associated with Hemadsorcion and Virulence. *Infection and Inmmunity*. Mayo 1982. Vol 35. 809 – 816.
18. KRONVALL., G. Differential staining of bacteria in clinical specimens using acridine orange bufferecd at low pH. *Acta Path. Microbiol. Scand. Sec. B.* 85 : 249 - 254.
19. LANIER., W. Comparison of Two Rapid Commercial Tests with Complement Fixation for Serologic Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* Infections. *Journal and clinical Microbiology*. Mayo 1995. Vol. 33. 5: 1212 – 1214.
20. LINARES., S. Valoración de la Coloración Naranja de Acridina como prueba Diagnóstica directa de *Mycoplasma pneumoniae*. Pontificia Universidad Javeriana. 2000. 3 – 16.
21. MARTINEZ., O. Neumonía por *Mycoplasma pneumoniae* en el hospital de La Misericordia. *Actualizaciones Pediátricas*. Fundación Santa Fe. 1993. Vol. 3. 4 : 166 – 170.
22. MATTAR., Salim. Bacteriología Clínica: Estudio etiológico de las enfermedades infecciosas de origen bacteriano. Editorial CEJA. 1998. 329.

23. MIMS., Cedric. Microbiología medica. Editorial Mosby/Doyma Libros. 1995. 22.2, 22.5.
24. OLIVEROS., S. Seroprevalencia de Mycoplasma y Legionella en las neumonías Atípicas en los servicios de neumología de algunos Hospitales de Santafe de Bogotá. Pontificia Universidad Javeriana. 1993. 3, 6 – 8, 10 – 15, 21 –26.
25. PUMAROLA., A. Microbiología y Parasitología Medica. Micoplasmas. 1992. 50: 525 – 531.
26. RESTREPO., A. Fundamentos de Medicina. Enfermedades Infecciosas. 5ª Edición. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín 1998. 132, 137, 482 – 492.
27. REYES., M. Infección, alergia y enfermedad respiratoria en el niño. 1ª Edición. Editorial Prensa Moderna. Cali, Colombia. 1986. 219-220.
28. ROSENDAL. S., Enumeration of Mycoplasma after orange staining. *Apellide and environmental microbiology*. Abril 1981. 1000-1002.
29. SCHAEFFER., W. Fluorometric Quantitation of Broth-Cultured Mycoplasmas by Using Alkaline Ethidium Bromide. *Journal of clinical Microbiology*. Mayo 1993. Vol. 31. 5 : 1303 – 1307.

30. SMIT. Epidemiología de las enfermedades infecciosas. Volumen II. Editorial McGraw-Hill. Capitulo 10. Vol. 2. 177 – 187. 1986.
31. SMIT. Tratado Medicina Interna. Enfermedades por Micoplasmas. Volumen II. Editorial McGraw-Hill. 1986. 160: 1905 – 1915.
32. TINTINALLI., J. Medicina de Urgencias. Neumonías Virales y por *Mycoplasma* en adultos. Volumen I. Cuarta Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. 1998. 65: 500 – 503.
33. TRUJILLO., H. Neumonía por *Mycoplasma pneumoniae* en 107 niños de Medellín. *Actualizaciones Pediátricas*. Fundación Santa Fe. 1998. Vol. 8. 1 : 20 – 23.
34. TULLY., J. Enhanced isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from throat washings with a newly modified culture medium. *The journal of Infectious diseases*. Abril 1979. Vol. 13. 4: 478 – 482.
35. VIVES., J. Manual de Técnicas de laboratorio en Hematológica. 2ª Edición. Editorial Masson. 1997. 104.
36. WARIS. M., TOIKKA. P., Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children. *Journal of Clinical Microbiology*. Nov. 1998. Vol. 36. 11: 3155 – 3159.

37. ZABALETA., S. Implementación de la coloración Naranja de Acridina "SPOT-TEST" para el diagnóstico de *Mycoplasma pneumoniae*. Pontificia Universidad Javeriana. 1999. 1- 26.

ANEXOS

ANEXO 1

TEST - SPOT “Coloración Naranja de Acridina”

* **Principio** : El test SPOT “Naranja de Acridina”, es un colorante fluorocromático el cual se une a los ácidos nucleicos de la bacteria y otras células. Por medio de los rayos ultravioleta el naranja de acridina tiñe el ADN de naranja.

* **Materiales y reactivos** :

- Láminas con muestras provenientes de tracto respiratorio
- Colorante Naranja de acridina
- Agua destilada
- Metanol

* **Procedimiento** :

- Se coloca la muestra proveniente de tracto respiratorio sobre una lámina
- Se fija con metanol durante un minuto, dejándola secar a temperatura ambiente.
- Se agrega el colorante de acridina durante 30 minutos

- Se lava el exceso de colorante con agua destilada durante 30 minutos y se deja secar a temperatura ambiente.
- Se observa en el microscopio de fluorescencia con aceite de inmersión usando el objetivo de 100X.

*** Resultados e Interpretación :**

- Prueba positiva : Se observa un punto fluorescente de tamaño muy pequeño en un campo verde oscuro.
- Prueba negativa : No se observa ninguna estructura fluorescente.

ANEXO 2

Caldo PPLO

* **Principio** : El crecimiento de *Mycoplasma pneumoniae* se detecta por la capacidad de estos microorganismo de producir ácido a partir de glucosa.

* **Procedimiento** :

- Inocular la muestra (hisopados nasofaríngeo)
- Incubar durante 5 – 7 días a 35° C
- Observar diariamente para detectar cambios de color y turbidez

* **Resultados e Interpretación** :

- Prueba positiva : Un cambio del indicador sin turbidez hace que el medio vire de verde a amarillo, indicando la presencia de *Mycoplasma pneumoniae*.
- Prueba Negativa : El indicador del caldo no vira.

ANEXO 3

Medio bifásico azul de metileno-glucosa

* **Principio** : Medio selectivo y enriquecido en el cual *Mycoplasma pneumoniae* metaboliza glucosa para producir ácido láctico.

* **Procedimiento** :

- Inocular la muestra (hisopados nasofaríngeo)
- Incubar durante 15 días a 35° C
- Observar diariamente para detectar cambios de color y turbidez

* **Resultados e Interpretación** :

- Prueba positiva : Un cambio gradual leve del indicador del pH en 8 – 15 días, sin turbidez macroscópica y la formación de colonias en forma de huevo frito sobre la fase sólida.
- Prueba negativa : El medio conserva el color inicial tanto en la fase sólida como en la líquida.

ANEXO 4

Agar modificado para Mycoplasma

* **Principio** : El *Mycoplasma pneumoniae* fermenta glucosa para producir ácido, evidenciándose su crecimiento por la formación de colonias en forma de huevo frito.

* **Procedimiento** :

- Resiembra del agar bifásico azul de metileno
- Incubar durante 15 días a 35° C
- Observar diariamente la superficie del agar con estereoscopio en busca de las pequeñas colonias del microorganismo.

* **Resultados e Interpretación** :

- Prueba positiva : Presencia de colonias en forma de huevo frito.
- Prueba negativa : No se observa crecimiento del microorganismo.

ANEXO 5

Prueba de Hemadsorción

* **Principio** : Entre los Micoplasmas respiratorios, *M. pneumoniae* es la única especie que adsorbe eritrocitos. Cuando se evidencia desarrollo de colonias en medios para aislamiento de micoplasmas sembrados con muestras provenientes de tracto respiratorio, se coloca una suspensión de eritrocitos de cobayo sobre la superficie del agar durante un tiempo determinado y luego se lava. Las colonias de *M. pneumoniae* absorberán algunos eritrocitos en la superficie de la colonia.

* **Materiales y reactivos** :

- Agar para micoplasmas con colonias sospechosas
- Glóbulos Rojos de cobayo al 5%

* **Procedimiento** :

- Cubrir la superficie de la placa de agar con 2 ml una suspensión de eritrocitos de cobayo al 5%
- Se deja incubar a 4°C durante una hora rotándolo ocasionalmente para evitar que se sedimentaran los glóbulos rojos
- Se lava la superficie tres veces con caldo PPLO para *Mycoplasma*

- Observar las colonias de *M. pneumoniae* con esteroscopio en un aumento de 50 X.

*** Resultados e Interpretación :**

- Prueba positiva: colonias con GR adsorbidos en la superficie = *Mycoplasma pneumoniae*.
- Prueba negativa : Colonias sin GR adsorbidos = especies de Micoplasma no *Mycoplasma pneumoniae*

ANEXO 6

Reducción de Tetrazolio

* **Principio** : Utilizando enzimas asociadas a la membrana celular del microorganismo *M. pneumoniae* puede reducir el compuesto incoloro cloruro de 2-(p-yodofenil)-3-nitrofenil-5-fenil tetrazolio a formazan, compuesto rojo insoluble que precipita en las células y hace que las colonias tomen un color rojo a negro-purpúreo por exposición prolongada al sustrato.

* **Materiales y reactivos** :

- Colonias aisladas en Agar para mycoplasmas.
- 0.21 g de Cloruro de 2-(p-yodofenil)-3-nitrofenil-5-fenil tetrazolio para 100 ml de agua destilada, esterilizar por filtración y conservar en botella ámbar.

* **Procedimiento** :

- Cubrir la superficie de la placa de agar que contiene las colonias del microorganismo con 2 ml del reactivo de tetrazolio.
- Incubar la placa a 35° C durante 60 minutos.
- Examinar las colonias usando estereoscopio.

*** Resultados e Interpretación :**

- Prueba positiva : las colonias de *M. pneumoniae* se oscurecen visiblemente y se harán rojas o purpura después de 60 minutos. Por incubación prolongada (3 a 4 horas) las colonias se ponen negras.
- Prueba negativa : no se notan cambios de color después de 60 minutos.

ANEXO 7

Prueba de Inmunofluorescencia Directa (Mycoplasma IFA Ridascreen)

* **Principio** : Se utiliza para hallar Ag directamente en la muestra, para lo cual se emplean Ac de gran especificidad contra el determinante antigenico que se va a estudiar, marcados con una sustancia fluorescente.

* **Materiales y Reactivos** :

- Laminas con muestras obtenidas del crecimiento del *Mycoplasma* en el medio bifásico.
- Reactivo No. 1 Anticuerpo IgM monoclonal anti *Mycoplasma pneumoniae* .
- Reactivo No. 2 Anticuerpo IgG anti-anti *Mycoplasma pneumoniae* obtenido de ratón marcados con fluoresceína.
- Agua destilada
- Metanol

* **Procedimiento** :

- Se coloca la muestra en una lámina y se deja secar a temperatura ambiente

- Se fija durante un minuto con metanol, se deja escurrir el exceso y se permite su secado al aire.
- Se colocó una gota del Anticuerpo monoclonal (ratón) *Mycoplasma pneumoniae* (Reactivo No. 1) durante treinta minutos en cámara húmeda
- Se lavó con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente
- Se coloca una gota del anticuerpo IgG anti-anti *Mycoplasma pneumoniae* obtenido de ratón marcados con fluoresceína (Reactivo No. 2) durante treinta minutos en cámara húmeda
- Se lava con agua destilada y se deja secar a temperatura ambiente
- Se observarse en el microcopio de Fluorescencia usando el aumento de 100X con aceite de inmersión

*** Resultados e Interpretación :**

- Prueba Positiva : *Mycoplasma pneumoniae* se observó como un punto pleomórfico verde fluorescente en contraste con un fondo negro.
- Prueba negativa : Ausencia de microorganismos pleomórficos fluorescentes.

ANEXO 8

Composición de los Medios de cultivo usados para la identificación de *Mycoplasma pneumoniae*

Medios Componentes	CALDO	AGAR	BIFÁSICO	
	PPLO	Agar Modificado	Fase sólida	Fase líquida
GLUCOSA	0.4 g	0.4 g	0.4 g	0.4 g
EXTRACTO DE LEVADURA	3.7 ml	3.7 ml	3.7 ml	3.7 ml
SUERO INACTIVADO	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
ANTIBIÓTICOS	Penicilina y Ampicilina	Penicilina y Ampicilina	Penicilina y Ampicilina	Penicilina y Ampicilina
AZUL DE METILENO	0.14 ml	0.14 ml	0.14 ml	0.14 ml
ACETATO DE TALIO	6 ml (10%)	6 ml (10%)	6 ml (10%)	6 ml (10%)
ROJO DE FENOL	0.7ml	0.7ml	0.7ml	0.7ml
CALDO Micoplasma	100 ml	-	-	100 ml
AGAR BACTERIOLOGICO	-	1 g (Para 100ml)	1 g (Para 100ml)	-