

ARTÍCULO ORIGINAL / ORIGINAL ARTICLE

Diagnóstico molecular de neumonías bacterianas atípicas provenientes de la comunidad. Paraguay (2014-2017)

Molecular diagnosis of atypical bacterial pneumonias from the community. Paraguay (2014-2017)

María E. León¹, Aníbal Kawabata¹, Minako Nagai¹, Liliana Rojas¹, Gustavo Chamorro¹

¹Laboratorio Central de Salud Pública. Asunción, Paraguay.

Autor de correspondencia: maruleonayala@hotmail.com

DOI: <https://doi.org/10.32480/rscp.2018-23-1.139-146>

Recibido: 05/03/2018. Aceptado: 02/04/2018.

Resumen:

Objetivos: Determinar la frecuencia de neumonías bacterianas atípicas causadas por *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydomphila pneumoniae*, en niños y adultos de Paraguay durante el periodo 2014-2017 por técnicas moleculares.

Materiales y métodos: se incluyeron en este estudio 148 muestras de líquido pleural de niños y adultos con diagnóstico de neumonía adquirida en la comunidad (NAC) durante el periodo 2014 a febrero de 2017. Las muestras fueron remitidas al Laboratorio Central de Salud Pública por los Centros Centinelas y Centros Colaboradores de la Red de Vigilancia de Meningitis y Neumonías.

Resultados: La frecuencia general de neumonías atípicas resultó 1.4 % (2/148). Se detectó *Legionella pneumophila* en 0.7% (1/148) de los pacientes con sospecha de neumonía y un caso *Mycoplasma pneumoniae* en 0.7% (1/148).

Conclusión: Los agentes atípicos presentan manifestaciones inespecíficas y variables de un caso a otro, haciéndolas difíciles de distinguir de otras etiologías. Los nuevos enfoques del diagnóstico microbiológico son prometedores, se espera que las pruebas de diagnóstico molecular para estos patógenos sean importantes herramientas en el laboratorio clínico.

Palabras clave: Neumonías atípicas, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, PCR.

Abstract:

Objectives: To determine the frequency of atypical bacterial pneumonias caused by *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydomphila pneumoniae*, in children and adults of Paraguay during the period 2014-2017 by molecular techniques.

Materials and methods: We included 148 pleural fluid samples from children and adults diagnosed with community-acquired pneumonia (CAP) during the period 2014 to February 2017. Samples were sent to the Central Public Health Laboratory by the Sentinel Centers and Collaborating Centers of the Meningitis and Pneumonia Surveillance Network.



Results: The general frequency of atypical pneumonias was 1.4% (2/148). *Legionella pneumophila* was detected in 0.7% (1/148) of the patients with suspected pneumonia and one *Mycoplasma pneumoniae* case in 0.7% (1/148).

Conclusion: Atypical agents present nonspecific and variable manifestations from one case to another, making them difficult to distinguish from other etiologies. The new approaches to microbiological diagnosis are promising, it is expected that molecular diagnostic tests for these pathogens are important tools in the clinical laboratory.

Key words: Atypical pneumonias, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, PCR.

1.- INTRODUCCIÓN

La neumonía bacteriana atípica, es una infección pulmonar causada por agentes bacterianos distintos a los tradicionales (1, 2) que no sigue el curso clínico o radiológico habitual (3, 4). Es una enfermedad frecuente en todas las edades, pero especialmente en niños del tercer mundo (5), que tiende a provocar síntomas más leves que la neumonía típica. Las bacterias que más frecuentemente causan esta patología son *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydophila pneumoniae* (6, 8).

La legionelosis, es causada por *L. pneumophila* y produce neumonía de la comunidad (NAC) en pacientes mayores de 50 años, y más a menudo en hombres que en mujeres (9). El organismo se encuentra naturalmente en el medio ambiente y la infección se asocia con la inhalación de agua en forma de aerosol de fuentes como bañeras de hidromasaje y torres de enfriamiento (10). *Mycoplasma pneumoniae* representa aproximadamente del 15% al 20% de todos los casos de neumonía adquirida en la comunidad, es cíclica y es una causa común de brotes (11, 13). *C. pneumoniae* es más común en los niños, pero también se ha asociado con una enfermedad grave en adultos. Un meta análisis informó una asociación con el cáncer de pulmón en pacientes con infecciones previas por *C. pneumoniae* (14).

La presentación clínica puede confundirse con la causada por otros agentes infecciosos y el cultivo, cuando es posible, es poco sensible o lento (15). Por otra parte, los estudios serológicos, en ocasiones, sólo permiten confirmar, pero no establecer el diagnóstico con la suficiente rapidez como para ser de utilidad en la práctica clínica (16). Lógicamente, esto ha llevado a la necesidad de establecer pautas terapéuticas empíricas que se utilizan de forma rutinaria ante las sospechas de infecciones causadas por estos microorganismos. Estos gérmenes atípicos no responden a los antibióticos betalactámicos y pueden tener un pronóstico diferente causando causar complicaciones graves en algunos pacientes (17, 19). La incorporación de una técnica molecular que identifique gérmenes atípicos dentro de la Vigilancia de las Enfermedades Respiratorias en nuestro país es muy importante para ampliar el diagnóstico de dichas patologías. La PCR es una prueba de alta sensibilidad y especificidad (20, 22), puede identificar los patógenos una vez iniciado el cuadro clínico, no necesita organismos viables y es útil para estudiar afecciones pulmonares y extra pulmonares.

2.- METODOLOGÍA

Diseño del estudio: se incluyeron en este estudio 148 muestras de líquido pleural remitidas al Laboratorio Central de Salud Pública por los Centros Centinelas y Centros Colaboradores de la Red de Vigilancia de Meningitis y Neumonías (VIMENE), provenientes de pacientes con diagnóstico de neumonía adquirida en la comunidad (NAC) durante el periodo 2014 a febrero de 2017 y cuyos resultados fueron negativos para *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*.

Técnicas moleculares: La extracción del ADN se realizó por metodología automatizada con el equipo Magna Pure (Roche, Alemania) utilizando Magna Pure Compact Nucleic Acid Isolation kit I. Se realizó la identificación de las bacterias atípicas (*Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydophila pneumoniae*) mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) amplificando genes constitutivos de estas bacterias, para lo cual se utilizaron cebadores específicos (*Mycoplasma pneumoniae* (PI, 483 bp), *Legionella pneumophila* (mip 124bp) y *Chlamydophila pneumoniae* (omp A 368 bp) ya descritos (23, 24) Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización a 94 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 94 °C por 30 seg, 60 °C por 1 min y 72 °C por 1 min. La extensión final se realizó a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% en PowerPac Basic (BIO RAD) con tampón TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM de ácido acético glacial, 1 mM EDTA, pH 8,0) a 100 V durante 30 min. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 UG/ul) y se registraron en imágenes con GelDoc (BIO RAD). Los tamaños de los productos de PCR se determinaron por comparación con el marcador de peso molecular (escala de 100 pb; Novagen, Inc.).

Análisis estadístico: Los resultados obtenidos fueron descriptos a través de medidas de tendencia central y dispersión, frecuencias absolutas y porcentajes. Los programas utilizados fueron la planilla Excel para la confección de la base de datos y Stata.11 para el análisis estadístico.

3.- RESULTADOS

Se estudiaron un total de 148 muestras de líquido pleural. La edad de los pacientes está comprendida entre 1 mes y 86 años. El 53.40 % corresponde a niños menores de 5 años. **Tabla 1:** El 52.00% (n=77) fueron muestras provenientes de los hombres. El 61.30 % de las muestras proviene de pacientes del departamento Central (89/148) y el 9.4 % de Asunción (14/148).

Tabla 1: Distribución según Departamento, Grupo de edades y Sexo. Neumonías atípicas. Paraguay. 2016

Departamento	n	%	IC 95%	IC 95%
CONCEPCION	2	1.7	0.2	5.9
SAN PEDRO	4	3.4	0.9	8.4
CORDILLERA	7	5.9	2.4	11.7
GUAIRA	4	3.4	0.9	8.4
CAAGUAZU	3	2.5	0.5	7.2
CAAZAPA	2	1.7	0.2	5.9
ITAPUA	3	2.5	0.5	7.2
MISIONES	1	0.8	0	4.6
PARAGUARI	1	0.8	0	4.6
ALTO PARANA	4	3.4	0.9	8.4
CENTRAL	73	61.3	52	70.1
AMAMBAY	1	0.8	0	4.6
CANINDEYU	1	0.8	0	4.6
BOQUERON	1	0.8	0	4.6
PTE HAYES	1	0.8	0	4.6
ASUNCION	11	9.2	4.7	15.9
Total	119	100		
Grupo de Edades				
4 años, IQ₂₅ 1 – IQ₇₅ 14 años				
0 a 4	71	53.4	44.5	62.1
5 a 9	18	13.5	8.2	20.5
10 a 14	13	9.8	5.3	16.1
15 a 19	6	4.5	1.7	9.6
20 a 24	5	3.8	1.2	8.6
25 a 29	1	0.8	0	4.1
30 a 34	3	2.3	0.5	6.5
35 a 39	1	0.8	0	4.1
Mayor o igual a 40	15	11.3	6.5	17.9
Total	133	100		
Sexo				
HOMBRE	77	52	43.7	60.3
MUJER	71	48	39.7	56.3
Total	148	100		

León ME, Kawabata A, Nagai A, Rojas L, Cghamorro G. Diagnóstico molecular de neumonías bacterianas atípicas provenientes de la comunidad. Paraguay (2014-2017)

La frecuencia general de neumonías atípicas resultó 1.4 % (2/148). Se detectó *Legionella pneumophila* en 0.7% (1/148) de los pacientes con sospecha de neumonía. Corresponde a una niña de 1 año de edad, procedente de San Lorenzo departamento Central. Se detectó *Mycoplasma pneumoniae* en 0.7% (1/148) de una niña de 13 años, procedente de Itauguá, departamento Central. No se encontraron casos de neumonías atípicas por *Chlamydophila pneumoniae*. En ambos casos se trata de muestras de pacientes del sexo femenino, con diagnóstico de neumonía grave con derrame pleural.

4.- DISCUSIÓN

La presencia de gérmenes atípicos en la etiología de la NAC es diferente dependiendo de los trabajos y de las áreas geográficas, ya que muchos de ellos pueden cursar con carácter epidémico y en relación con diferentes estaciones climáticas (25-27). Los resultados de este estudio evidencian que la presencia de estos patógenos es poco frecuente en las muestras respiratorias analizadas (1,4%) pero sugieren que estos microorganismos pueden ser agentes etiológicos de neumonías atípicas graves con derrame pleural y de otras patologías respiratorias.

Los agentes atípicos presentan manifestaciones inespecíficas y variables de un caso a otro, haciéndolas difíciles de distinguir de otras etiologías (28, 29). Son primordiales el cuadro clínico y el diagnóstico laboratorial para la confirmación de infección por estos agentes. Los nuevos enfoques para el diagnóstico microbiológico son prometedores, se espera que las pruebas de diagnóstico molecular para estos patógenos sean importantes herramientas en el laboratorio clínico (30, 31). De ahí la importancia de la implementación de esta técnica, ya que en Paraguay no se cuentan con datos epidemiológicos sobre esta patología y de esta manera queda instalada esta capacidad diagnóstica en el Laboratorio Central de Salud Pública, que es el laboratorio de referencia nacional del Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, lo que tendrá un impacto a largo plazo y a través de esto se puedan fomentar estrategias en salud pública.

5.- CONCLUSIÓN

Estas bacterias son cada vez más reconocidas como causa importante de neumonías atípicas en muchos países, por lo que se debería poder reconocer, diagnosticar y tratar las formas principales de la enfermedad. Hay poca referencia en la literatura sobre estudios epidemiológicos de prevalencia de neumonías atípicas en Paraguay y posiblemente se encuentra subdiagnosticada. Esto podría disminuir la efectividad de las pautas generales para el tratamiento de infecciones agudas de las vías respiratorias. Creemos, por lo tanto, que esta revisión debería allanar el camino para futuros estudios sobre este tema. También es importante analizar el impacto a corto y largo plazo de neumonías atípicas en el país.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Murdoch DR, Chambers ST. Atypical pneumonia: time to breathe new life into a useful term? *Lancet Infect Dis* 2009;9(8):512-519.
2. Berebichez-Fridman R, Blachman-Braun R, Azrad-Daniel S, Vázquez-Campuzano R, Vázquez-López R. Atypical pneumonias caused by *Legionella pneumophila*, *Chlamydophila pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae*. *Rev Med Hosp Gen Méx.* 2015;78(4):188-195.
3. Parra W. Neumonías atípicas. *Neumol Pediatr.* 2013;(8):74-78.
4. Sepúlveda A, Castet A, Bertrand P. Atypical pneumonia: mycoplasma and chlamydia pneumoniae. Making an accurate diagnosis and deciding when to treat. *Neumol Pediatr.* 2015;10(3):118-123.
5. Principi N, Esposito S, Blasi F, Allegra L. Role of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in Children with Community-Acquired Lower Respiratory Tract Infections. *Clinical Infectious Diseases.* 2001;32(9):1281–1289. doi: <https://doi.org/10.1086/319981>
6. Cunha B. The atypical pneumonias: clinical diagnosis and importance. *Clinical Microbiology and Infection.* 2006;12:12–24. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01393.x
7. Remington LT, Sligl W. Community-acquired pneumonia. *Curr Opin Pulm Med.* 2014;20(3) 215–24.
8. Inostroza E, Pinto R. Pneumonia due to atypical agents in children. *Revista Médica Clínica Las Condes.* 2017;(28):90-96.
9. Marchello C, Dale AP, Thai TN, Han DS, Ebell MH. Prevalence of Atypical Pathogens in Patients With Cough and Community-Acquired Pneumonia: A Meta- Analysis. *Annals of Family Medicine.* 2016;14(6):552-566. doi:10.1370/afm.1993
10. Phin N, Parry-Ford F, Harrison T, et al. Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. *Lancet Infect Dis.* 2014;14(10):1011–1021.
11. Omori R, Nakata Y, Tessmer HL, Suzuki S, Shibayama K. The determinant of periodicity in *Mycoplasma pneumoniae* incidence: an insight from mathematical modelling. *Sci Rep.* 2015;5:14473.
12. Klement EDF, Talkington O, Wasserzug R, Kayouf N, Davidovitch R, Dumke Y, Bar-Zeev R, Merav J, Boxman WL, Thacker D, Wolf T, Lazarovich Y, Shemer-Avni D, Glikman E, Jacobs I, Grotto C, Block, Nir-Paz R. Identification of risk factors for infection in an outbreak of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract disease. *Clin. Infect. Dis.* 2006;43:1239-1245.
13. Waites KB, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004;17:697-728.
14. Zhan P, Suo LJ, Qian Q, et al. Chlamydia pneumoniae infection and lung cancer risk: a meta-analysis. *Eur J Cancer.* 2011;47(5):742–747.
15. Ngeow YF, Suwanjutha S, Chantarojanasrii T, Wang F, Sanieel M, Alejandria M, Hsueh PR, Ping-Ing PR, Park SC, Sohn J, Aziah AM, Liu Y, Seto WH, Ngan CC, Hadiarto M, Hood A, Cheong YM. An Asian study on the prevalence of atypical respiratory

León ME, Kawabata A, Nagai A, Rojas L, Cghamorro G. Diagnóstico molecular de neumonías bacterianas atípicas provenientes de la comunidad. Paraguay (2014-2017)

- pathogens in community-acquired pneumonia. *Int. J. Infect. Dis.* 2005;9:144-153.
16. Thurman KA, Warner AK, Cowart KC, Benitez AJ, Winchell JM. Detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, and *Legionella* spp. in clinical specimens using a single-tube multiplex real-time PCR assay. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;70:1–9.
 17. Allegra L, Blasi F. Problems and perspectives in the treatment of respiratory infections caused by atypical pathogens. *Pulm Pharmacol Ther.* 2001;14:21–27.
 18. Thibodeau KP, Viera AJ. Atypical pathogens and challenges in community-acquired pneumonia. *Am Fam Physician.* 2004;69(7):1699-706.
 19. Bartlett JG. Is activity against "atypical" pathogens necessary in the treatment protocols for community-acquired pneumonia? Issues with combination therapy. *Clin Infect Dis.* 2008;47(3):232-6. doi: 10.1086/591409.
 20. Templeton KE, Scheltinga SA, van den Eeden WC, Graffelman AW, van den Broek PJ, Claas EC. Improved diagnosis of the etiology of community-acquired pneumonia with real-time polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 2005;41:345–351.
 21. Rätty R, Rönkkö E, Kleemola M. Sample type is crucial to the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia by PCR. *J Med Microbiol.* 2005;54:287–291.
 22. Chang H, Chan L, Shao P, Lee P, Chen J, Lee C. Lu C. Huang Li. Comparison of real-time polymerase chain reaction and serological test for the confirmation of *Mycoplasma pneumoniae* infection in children with clinical diagnosis of atypical pneumonia. *J Microbiol, Immunol Infect.* 2014;47:137-144.
 23. Strålin K, Korsgaard J, Olcén P. Evaluation of a multiplex PCR for bacterial pathogens applied to bronchoalveolar lavage. *European Respiratory Journal.* 2006;28:568-575. DOI: 10.1183/09031936.06.00006106
 24. Plnar A, Bozdemir N, Kocagöz T, Alaçam R. Rapid detection of bacterial atypical pneumonia agents by multiplex PCR. *Cent Eur J Publ Health*2004;12(1):3-5.
 25. Miranda J. Atypical microorganisms in children with community - Acquired pneumonia: EsSalud Grau Emergency Hospital - Period 2008. *Acta méd. Peruana.* 2012;29(1):17-22.
 26. Garcia-Vidal C, Labori M, Viasus D, Simonetti A, Garcia-Somoza D, Dorca J, et al. Rainfall Is a Risk Factor for Sporadic Cases of *Legionella pneumophila* Pneumonia. *PLoS ONE.* 2013;8(4):e61036. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061036>
 27. Chen ZR, Yan YD, Wang YQ, ZhuH., ShaoX., Xu J. Epidemiology of community-acquired *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infections among hospitalized Chinese children, including relationships with meteorological factors. *Hippokratia.* 2013;17: 20–26.
 28. Cosentini R, Tarsia P, Blasi F, Roma E, Allegra L. Community-acquired pneumonia: role of atypical organisms. *Monaldi Arch Chest Dis.* 2001;56(6):527-34.
 29. Samransamruajkit R, Jitchaiwat S, Wachirapaes W, Deerojanawong J, Sritippayawan S, Prapphal N: Prevalence of *Mycoplasma* and *Chlamydia pneumoniae* in severe community-acquired pneumonia among hospitalized children in Thailand. *Jpn J Infect Dis.* 2008;61:36-39.

León ME, Kawabata A, Nagai A, Rojas L, Cghamorro G. Diagnóstico molecular de neumonías bacterianas atípicas provenientes de la comunidad. Paraguay (2014-2017)

30. Gadsby NJ, Helgason KO, Dickson EM, Mills JM, Lindsay DS, Edwards GF, Hanson MF, Templeton KE, ESCMID Study Group for Molecular Diagnostics, ESCMID Study Group for Legionella Infections, Basel, Molecular diagnosis of Legionella infections—clinical utility of front-line screening as part of a pneumonia diagnostic algorithm. *J Infect.* 2016;72:161–170.
31. Torres A, Lee N, Cilloniz C, Vila J, Van der Eerden M. 2016. Laboratory diagnosis of pneumonia in the molecular age. *Eur Respir.* 2016;48:1764–1778. doi: 10.1183/13993003.01144-2016.