

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

Ángela Rocío Copete Rengifo

Microbióloga y Bioanalista

Magister en Microbiología y Bioanálisis

Escuela de Microbiología

Grupo Investigador de Problemas en Enfermedades Infecciosas
Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia
2016

Comunicaciones Escuela de Microbiología
microbiologia.udea.edu.co / microcomunica@gmail.com

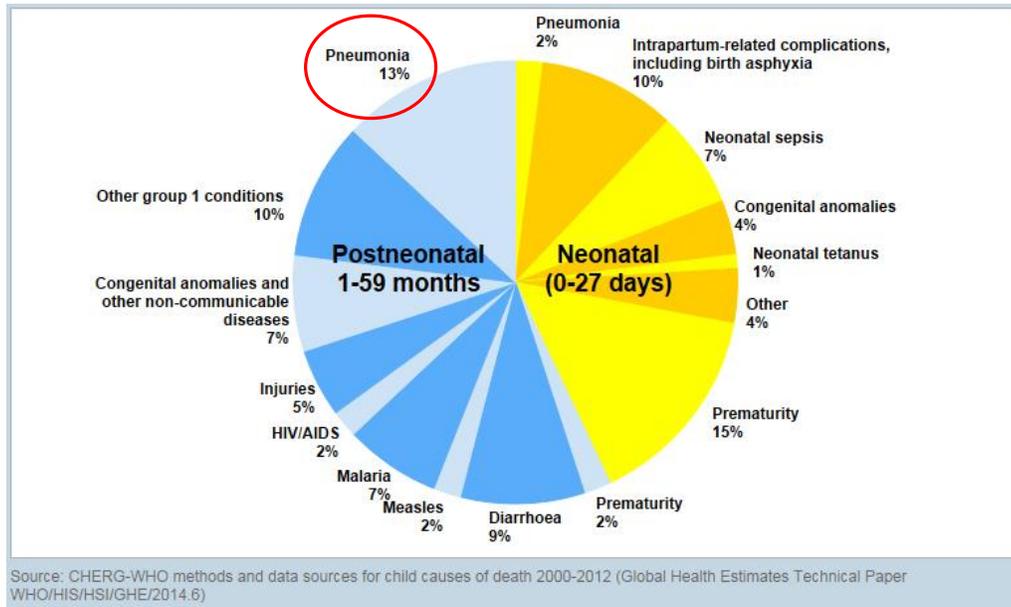


INTRODUCCIÓN

Introducción

Neumonía en pediatría

Principales causas de muerte en niños a nivel mundial 2000-2012 (OMS)



- Anualmente se presentan 270 casos/100.000 niños menores de 2 años.
- Es la sexta causa de consulta mas frecuente en los servicios de urgencias en la población entre 0-4 años.
- La tercera causa de mortalidad en niños menores de un año.

Introducción

Neumonía Adquirida en la Comunidad (NAC)

Definición de NAC

- Se desarrolla mientras el paciente vive en su comunidad.
- Se adquiere por fuera del ambiente hospitalario.
- En el ambiente hospitalario aparece dentro de las primeras 48 horas después del ingreso o más de 7 días después del egreso.



Introducción

M. pneumoniae como agente etiológico de NAC

Etiología de la NAC en 311 pacientes hospitalizados. Valle de Aburrá 2005–2006

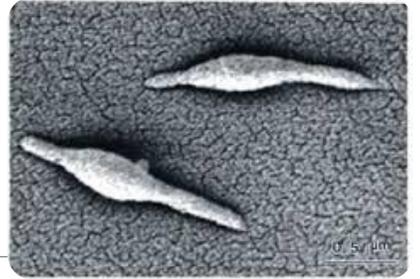
Etiologic agent	Diagnostic Category		Unique pathogen (%) [*]	Total/311 patients (%)
	Definite	Probable		
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	28	58	48 (55.8)	86 (27.6)
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	31	12	20 (46.5)	43 (13.8)
Influenza A B	31	0	11 (35.5)	31 (10)
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	17	10	9 (33.3)	27 (8.7)
Adenovirus	22	0	4 (18.1)	22 (7.1)
<i>Coxiella burnetii</i>	6	12	8 (44.4)	18 (5.8)
Respiratory Syncytial Virus	13	0	2 (15.3)	13 (4.2)
Enterobacteriaceae [‡]	5	6	8 (72.7)	11 (3.5)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	9	0	5 (55.5)	9 (2.9)
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	3	6 (75)	8 (2.6)
<i>Haemophilus influenzae</i>	0	7	2 (28.5)	7 (2.2)
Other Gram-positive cocci [§]	5	2	6 (85.7)	7 (2.2)
Parainfluenza virus 1,2,3	6	0	1 (16.6)	6 (1.9)
<i>Legionella pneumophila</i>	5	1	2 (33.3)	6 (1.9)
Environmental Gram-negative bacilli	1	2	1 (33.3)	3 (1)
<i>Histoplasma capsulatum</i>	1	0	1	1 (0.3)
<i>Moraxella catarrhalis</i>	0	1	0	1 (0.3)
TOTAL	185 (61.9)	114 (38.1)	134 (44.8)	299 (100)

Etiología de la NAC en 525 niños hospitalizados. Valle de Aburrá 2011-2012. Datos no publicados

Respiratory pathogen	Age by groups			Total n (%)
	0-23 months N= 206 n (%)	2-4 years N= 213 n (%)	≥5 years N= 106 n (%)	
Respiratory syncytial virus	91 (44.2)	56 (26.3)	17 (16.0)	164 (31.2)
Parainfluenza virus	51 (24.8)	53 (24.9)	18 (17.0)	122 (23.2)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	54 (26.2)	51 (23.9)	17 (16.0)	122 (23.2)
Rhinovirus	41 (19.9)	49 (23.0)	21 (19.8)	111 (21.1)
Influenza virus	42 (20.4)	37 (17.4)	17 (16.0)	96 (18.3)
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	22 (10.7)	37 (17.4)	14 (13.2)	73 (13.9)
Adenovirus	32 (15.5)	27 (12.7)	9 (8.5)	68 (13.0)
<i>Moraxella catarrhalis</i>	23 (11.2)	15 (7.0)	3 (2.8)	41 (7.8)
Metapneumovirus	23 (11.2)	9 (4.2)	5 (4.7)	37 (7.0)
<i>Bordetella pertussis</i>	12 (5.8)	7 (3.3)	6 (5.7)	25 (4.8)
<i>Haemophilus influenzae</i>	12 (5.8)	7 (3.3)	5 (4.7)	24 (4.6)
Coronavirus	6 (2.9)	7 (3.3)	2 (1.9)	15 (2.9)

Introducción

Mycoplasma pneumoniae



Micrografía electrónica de una célula de *M. pneumoniae*

- Bacilo corto pleomórfico (10x200nm)
- Carente de pared celular
- Ingresa al tracto respiratorio por contacto con gotas que contienen la bacteria.
- Se adhiere a las células epiteliales del tracto respiratorio mediante un complejo de proteínas de adhesión (**P1**, P30, P90, Prot B y C, HMW 1-3).
- Manifestaciones clínicas: faringitis, traqueobronquitis, **neumonía**.
- La neumonía es usualmente autolimitada, pero pueden presentarse escasos casos de neumonía grave y fulminante.

Introducción

Brotos epidémicos de neumonía asociados con *M. pneumoniae*

Localización geográfica de los brotes epidémicos asociados con *M. pneumoniae* reportados entre 2000-2014

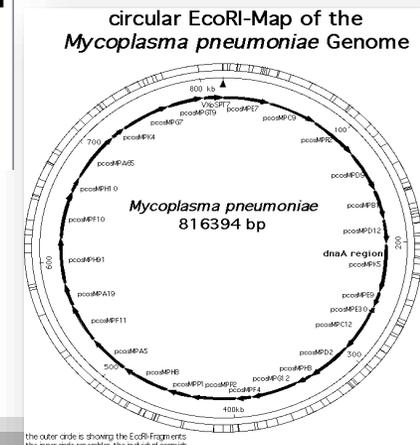
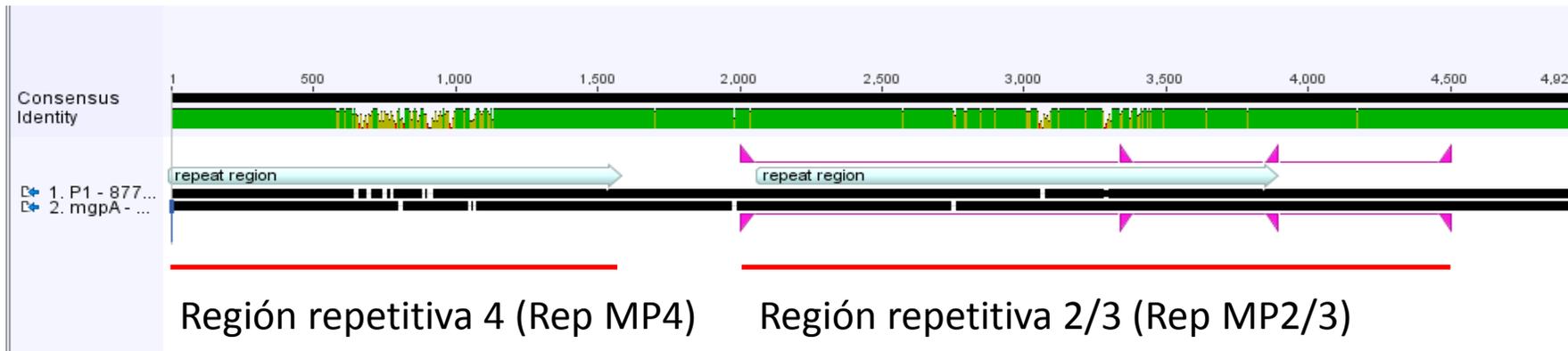


Nº	Lugar de reporte (Ciudad/Estado/Provincia-País)	Año	Número de casos	Sitio del brote
1	Nebraska-Estados Unidos	2014	55	Centro de pacientes con Alzheimer
2	Georgia-Estados Unidos	2012	83	Ciudadela universitaria
3	Santa Cruz de Tenerife-España	2011	14	Hospital universitario
4	Estados Unidos	2007	179	Barco de la Armada
5	Virginia-Estados Unidos	2011	125	Ocho escuelas de dos Condados
6	Yamagata-Japón	2010	83	Dos escuelas primarias
7	China	2011	45	Hogar de paso
8	Bordeaux-Francia	2011	6	Escuela primaria
9	Estados Unidos	2000	60	Hospital psiquiátrico

Introducción

Genotipificación de *M. pneumoniae* mediante el gen *P1*

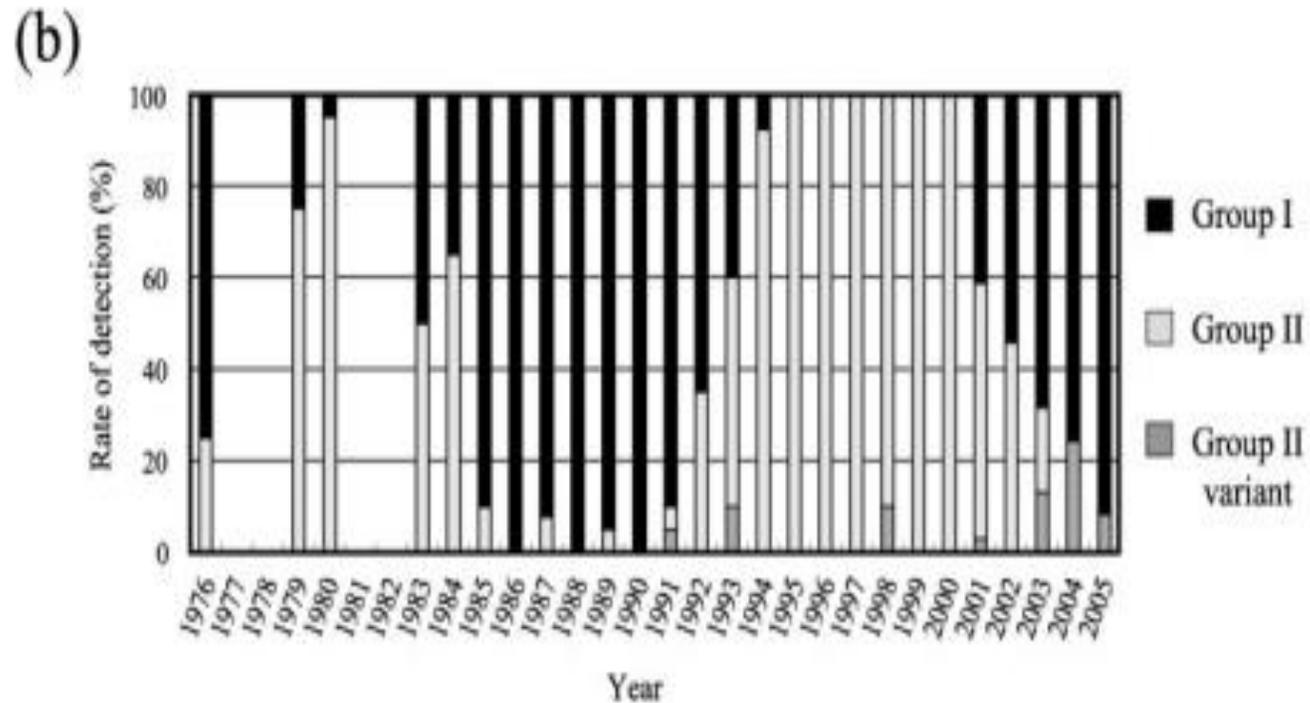
Secuencia de nucleótidos del gen *P1* (gen de copia única que codifica para la proteína p1) que permite clasificar las cepas en dos tipos: **Tipo 1 y Tipo 2.**



Introducción

Fenómeno de cambio de tipo

Fig. 2. Integrated data from *M. pneumoniae* typing in Japan between 1976 and 2005.



Estudio de genotipificación de 177 cepas clínicas de *M. pneumoniae* aisladas de pacientes con Bronquitis y Neumonía. Recolectadas durante 10 años en Japón.2007.

Introducción

Variantes genotípicas de *M. pneumoniae* por recombinación de las regiones repetitivas del gen *P1*

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

La secuencia de aminoácidos de las proteínas p1 de las variantes puede variar en su homología (56-95%), cuando se compara con la secuencia de las cepas de referencia Tipo 1(M129) y Tipo 2 (FH)

Introducción

Mutaciones en el gen 23s rRNA asociadas con resistencia a macrólidos

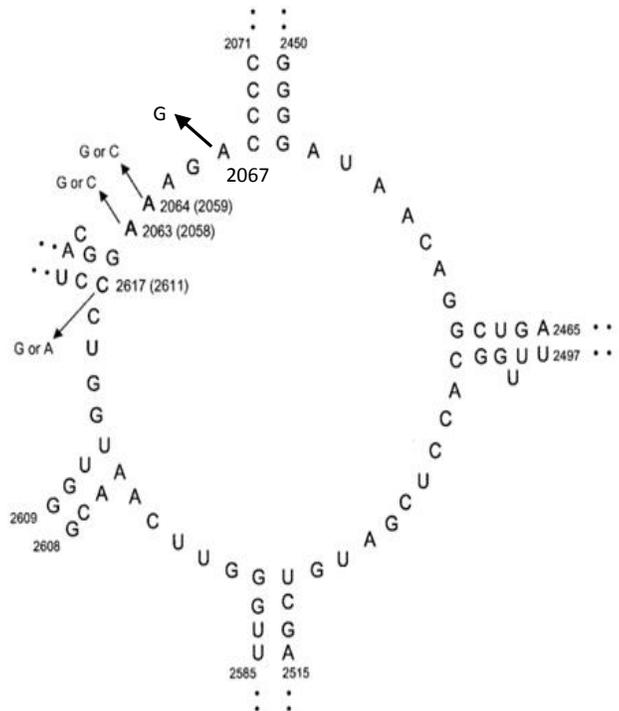


FIG. 2. Secondary structure of the peptidyltransferase loop in domain V of *M. pneumoniae* 23S rRNA. Positions of the newly found mutations (A2063C and C2617G), as well as previously reported in vitro mutations (A2063G, A2064G, and A2064C), in clinical isolates are indicated by using the numbering for *M. pneumoniae* 23S rRNA (accession no. X68422). The numbers in parentheses indicate *E. coli* numbering.

Opciones de tratamiento antimicrobiano de la NAC asociada con <i>M. pneumoniae</i>	
NAC adultos	NAC pediátrica
Macrólidos, Fluoroquinolonas Tetraciclinas	Macrólidos

Table 1 Antimicrobial activity of macrolides, fluoroquinolones, and minocycline against *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated from clinical samples

Antimicrobial agent	Susceptible strains (n = 423)	MIC range (µg/ml)				
		A2063G (n = 96)	A2064G (n = 7)	A2063C (n = 1)	C2617A (n = 1)	C2617G (n = 1)
Erythromycin	0.00195–0.0313	32 to >64	64 to >64	>256	1	8
Clarithromycin	0.00049–0.0313	32 to >64	16 to >64	>256	0.5	1
Azithromycin	0.00012–0.00195	16 to >64	16–64	16	0.0313	0.0313

Introducción

La circulación de cepas resistentes en el continente asiático ha venido incrementado significativamente desde 2000

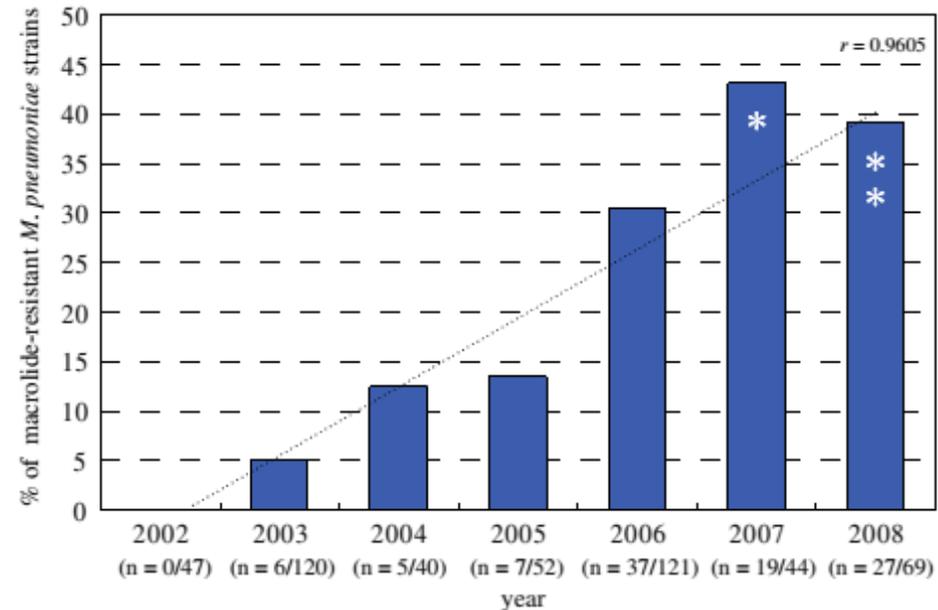


Fig. 2 Increases in numbers of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains from 2002 to 2008 in Japan according to our analyses. Asterisks indicate macrolide-resistant strains isolated from adult patients. The dotted line can be expressed by the equation $y = 7x - 8.62$ ($r = 0.9605$)

Introducción

Por qué es importante conocer esto en nuestro medio?

i) Porque *M. pneumoniae* es el segundo agente etiológico bacteriano detectado en los pacientes con NAC que requieren hospitalización.

ii) Porque **NO** se dispone de datos locales sobre la distribución regional de los genotipos de *M. pneumoniae*



- La distribución de los genotipos que circulan en los niños diagnosticados con NAC en el Valle de Aburrá, es similar a la reportada en otras regiones del mundo?
- Circulan en este grupo de pacientes cepas con mutaciones asociadas con resistencia a los macrólidos?
- Pueden coexistir en un mismo paciente varios genotipos de *M. pneumoniae*?

iii) Por posibles implicaciones que pueda tener el genotipo causante de la infección en el comportamiento clínico de la enfermedad, o en la respuesta a la terapia.

OBJETIVOS

Objetivos específicos

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

METODOLOGÍA

Metodología

Población de estudio



525 niños con NAC del proyecto macro “Caracterización clínica y etiológica de la NAC en niños hospitalizados en el área metropolitana de Medellín 2011-2013”. Código COLCIENCIAS 111534319142

Se incluyeron pacientes entre 1 mes y 17 años, hospitalizados por NAC documentada con Rx de tórax (opacidades nuevas), y al menos uno de los siguientes síntomas: fiebre >38.5°C, taquipnea y ruidos en la auscultación

Se excluyeron pacientes con: inmunodeficiencias innatas o adquiridas, fibrosis quística, alteraciones neurológicas o psiquiátricas, bronquiolitis, neoplasias hematológicas

73 niños con evidencia de NAC por *M. pneumoniae*

Serológica: Serología pareada (Vircell®-España)

Molecular: PCR comercial (Seeplex Pneumobacter® ACE-Corea)

Cuadruplicación de títulos de anticuerpos IgG y/o IgM

Detección del DNA de *M. pneumoniae* en la reacción de PCR

Metodología

Genotipificación de las muestras mediante los genes *P1* y *23s rRNA*



**146 muestras respiratorias
(esputos inducidos e HNF)**

Metodología

Análisis espacio-temporal de la distribución de los casos de NAC por *M. pneumoniae*

Análisis espacial

Se georeferenciaron los casos de NAC por *M. pneumoniae* que se encontraban ubicados en el área urbana de Medellín.



Se aplicaron estadísticos espaciales globales (Moran's I y Getis Ord) y locales (Moran's I y Getis Gi*)

Análisis temporal



Se exploró la distribución mensual de los casos de NAC por *M. pneumoniae*

RESULTADOS

Resultados

Características clínicas y socio-demográficas de los 73 pacientes estudiados (parte 1)

Característica	Niños con NAC positivos para <i>M. pneumoniae</i> (n=73)	Niños con PCR positiva del gen <i>P1</i> o <i>23S rRNA</i> (n=54)
Edad en años, Me (Riq)	2,0 (1,0-4,0)	3,0 (2,0-4,0)
Masculino n (%)	41 (56,2)	28 (51,9)
Tabaquismo pasivo, n (%)	32 (43,8)	22 (66,7)
N° de personas que conviven con el menor, Me (Riq)	5 (4 -6)	5 (4 - 6)
Asistencia a guarderías, n (%)	50 (68,5)	38 (70,4)
Días de síntomas, Me (Riq)	3,0 (2,0-6,0)	4,0 (3,0-7,0)
Días de hospitalización, Me (Riq)	4,0 (3,0-7,0)	4,0 (3,0-7,0)
Comorbilidades		
Asma, n (%)	17 (23,3)	14 (25,9)

Resultados

Características clínicas y socio-demográficas de los 73 pacientes estudiados (parte 2)

Característica	Niños con NAC positivos para <i>M. pneumoniae</i>	Niños con PCR positiva del gen <i>P1 o 23S rRNA</i>
	(n=73)	(n=54)
Síntomas		
Tos, n (%)	71 (97,3)	52 (96,3)
Fiebre, n (%)	68 (93,2)	50 (92,6)
Disnea, n(%)	53 (72,6)	40 (74,1)
Expectoración, n (%)	31 (42,4)	19 (35,2)
Signos		
Conciencia alterada n(%)	1(1,4)	1(1,9)
Aleteo nasal n(%)	4(5,5)	3 (5,6)
Adenopatías n(%)	3 (4,1)	3 (5,6)
Derrame pleural n(%)	2(2,7)	1 (1,9)
Gravedad de la neumonía		
Moderada n(%)	56(76,7)	42 (77,8)
Grave n(%)	16 (21,9)	11 (20,4)
Muy grave n (%)n(%)	1(1,4)	1(1,9)
Confección con otros patógenos respiratorios n (%)	55(75,3)	40(74,1)

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

Resultados

Caracterización genotípica de los pacientes mediante el gen *P1*

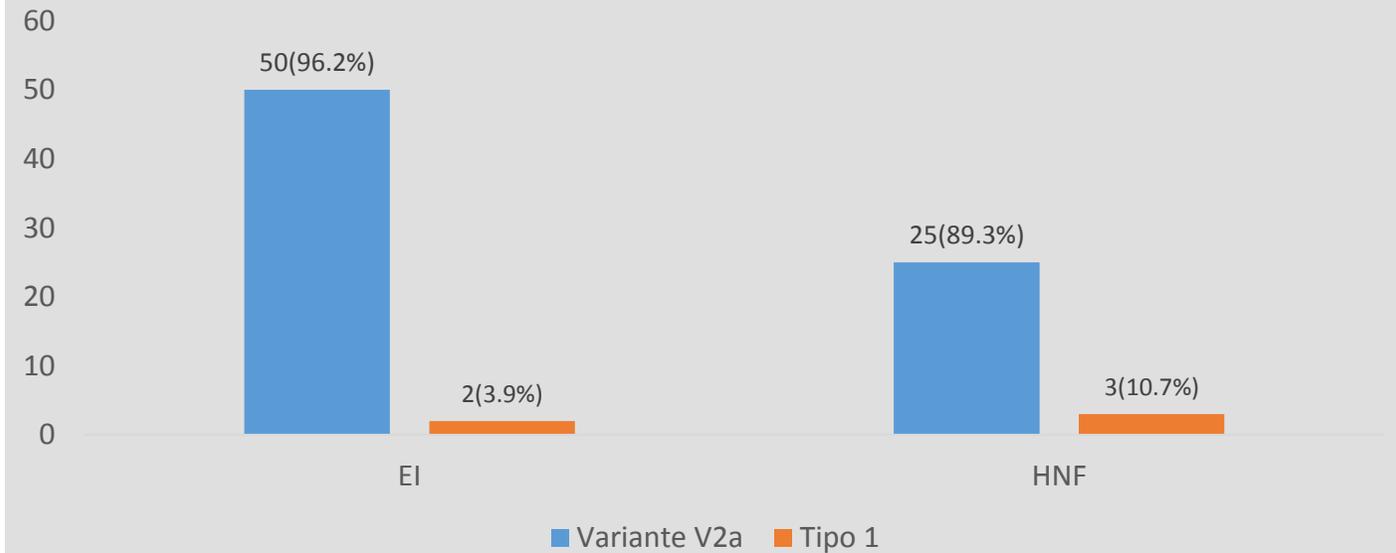
Distribución de los genotipos en los pacientes positivos para PCR del gen *P1*

50 pacientes con Variante V2a

2 pacientes con Tipo 1

Un paciente con Tipo 1 y V2a

Distribución de los genotipos de *M. pneumoniae* en las muestras respiratorias de los niños con NAC, empleando el gen *P1* como marcador molecular



Resultados

Caracterización genotípica de las muestras mediante el gen 23S rRNA

No se encontraron mutaciones asociadas con resistencia a macrólidos en las secuencias de DNA analizadas.

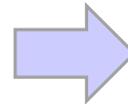
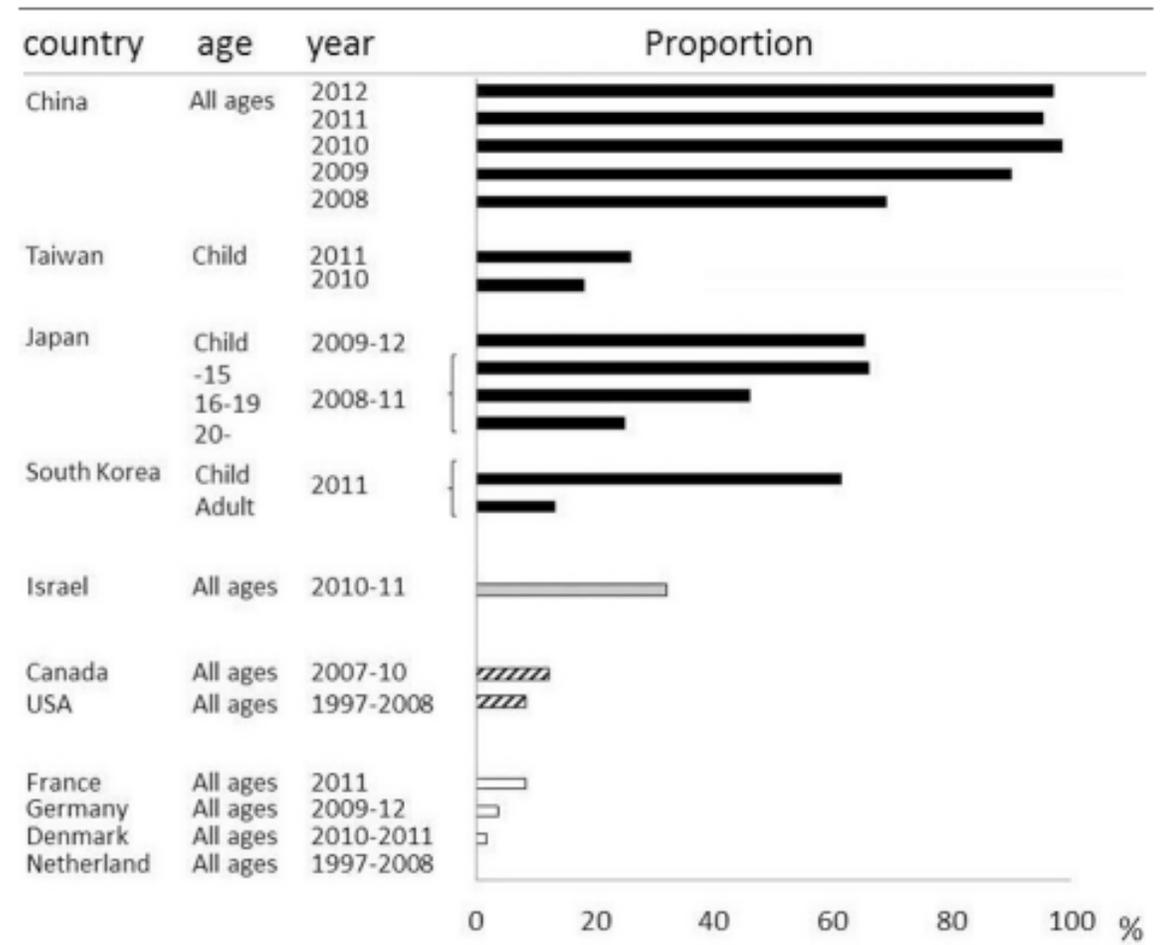
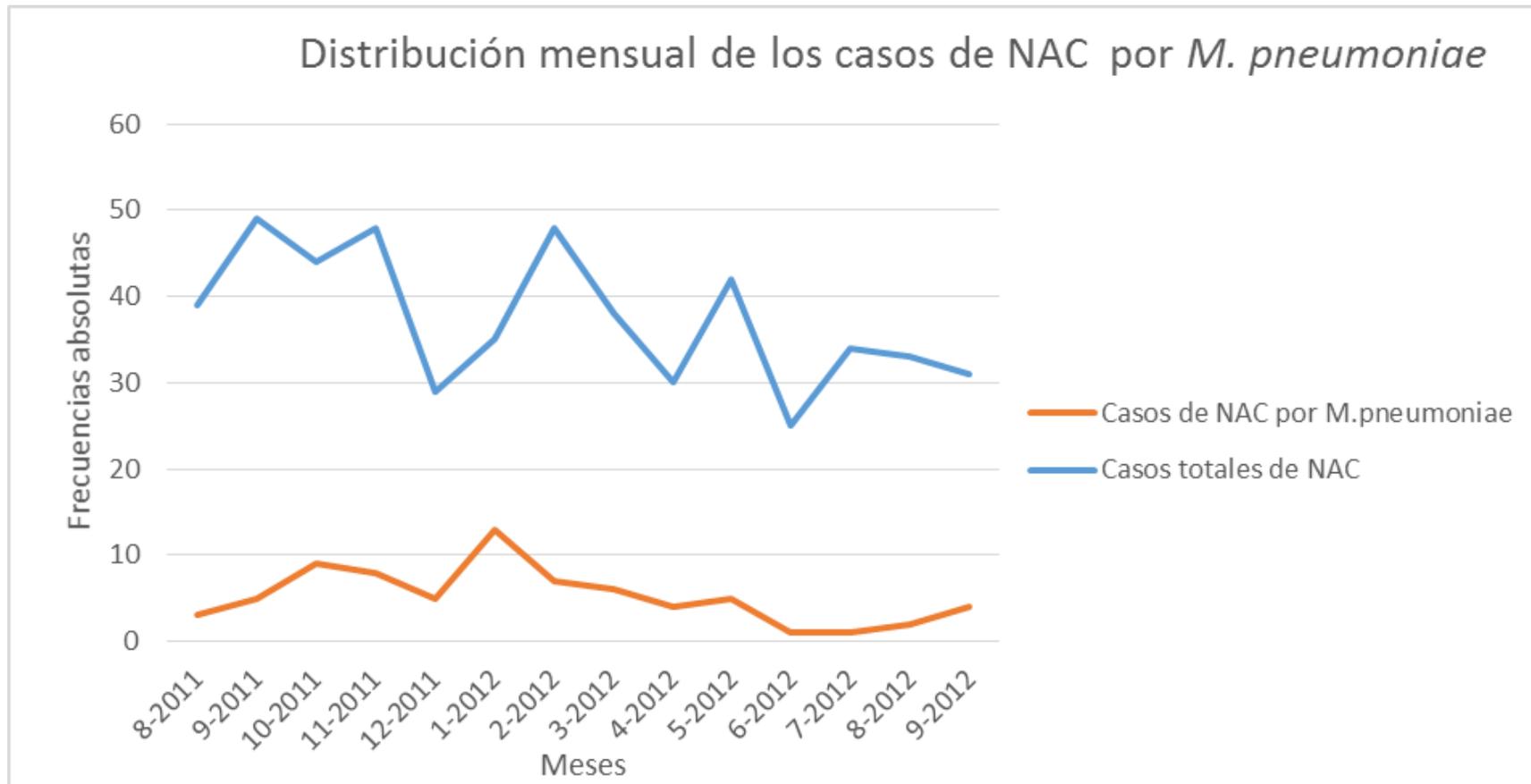


Table 2 | Proportions of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*.



Resultados

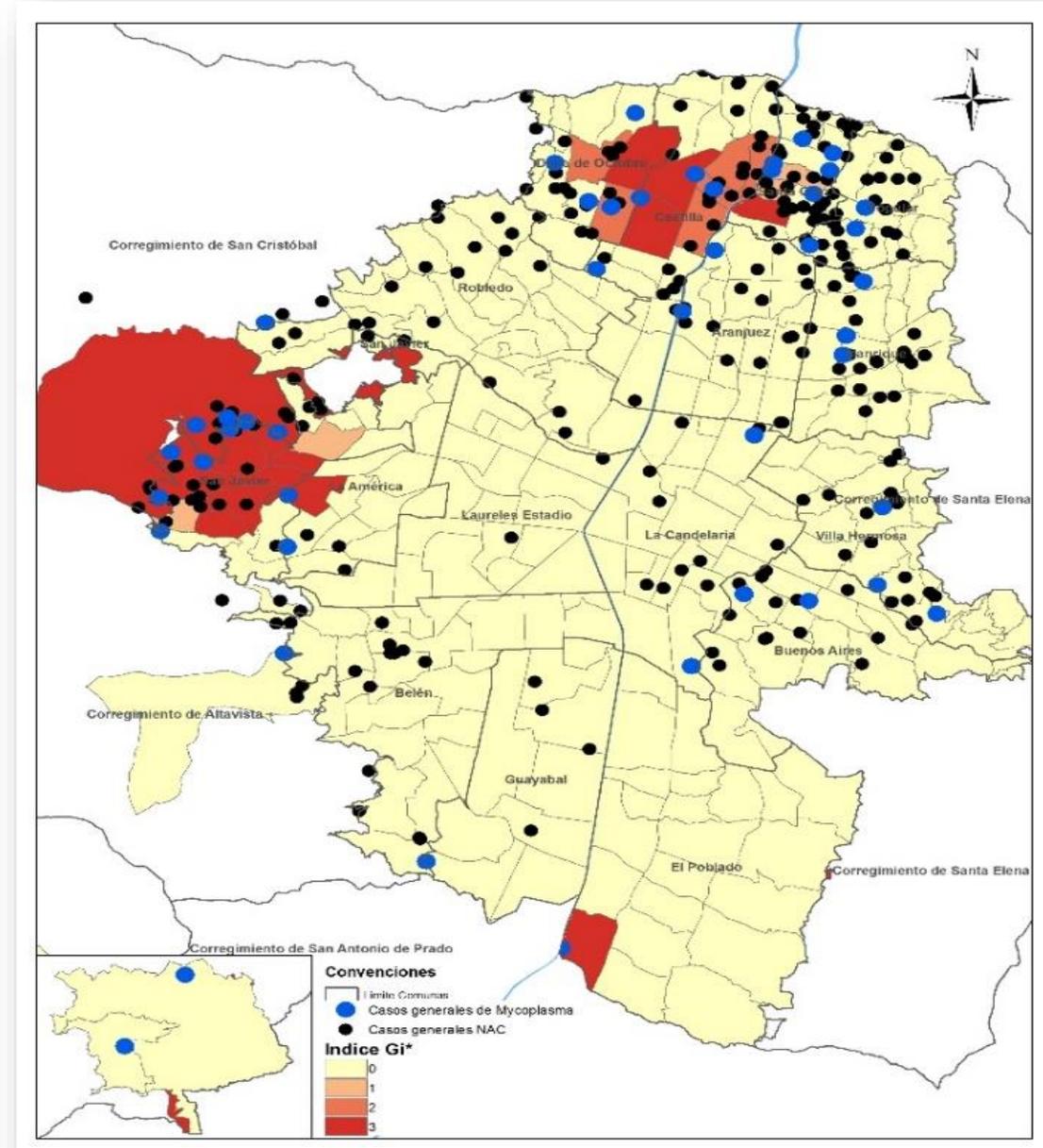
Distribución temporal de los casos de NAC por *M. pneumoniae*



48/73 pacientes tuvieron disponible la información de su dirección de residencia (área urbana de Medellín)

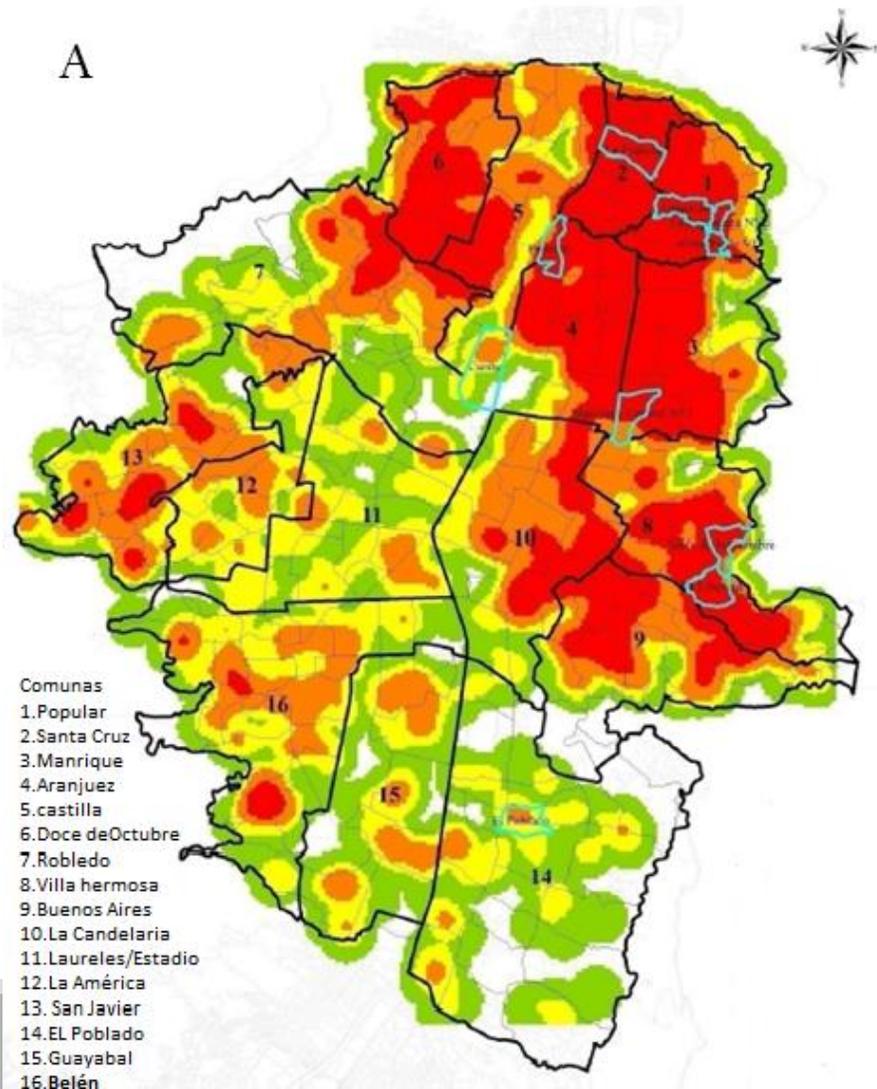
Resultados

Representación de la localización espacial en el mapa de Medellín de los casos de NAC por *M. pneumoniae* bajo el análisis local del estadístico de Getis-Ord G_i^*



Discusión

Distribución geográfica de la incidencia de TB



Existen factores (sociales, geográficos, de salud) que favorecen la diseminación de estos patógenos respiratorios en estas zonas de la ciudad.

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

EN RESUMEN...

Conclusiones

- La edad media de los niños incluidos en el presente estudio fue inferior a la descrita comúnmente en las neumonías asociadas con *M. pneumoniae*.
- La variante V2a predominó entre los niños con NAC en los que se detectó *M. pneumoniae*, variante de lejos más frecuente que el Tipo 1, el otro genotipo detectado en el medio.
- En este grupo de pacientes no se detectó la presencia de cepas con mutaciones asociadas con resistencia a macrólidos.
- Existen dos zonas de Medellín en las que se observó un agrupamiento de casos de NAC por *M.pneumoniae*, similar a el reportado en otras infecciones respiratorias.
- Existen variaciones importantes en el rendimiento de los protocolos de PCR empleados en la detección de *M. pneumoniae*.

Limitaciones

- No se dispuso de cultivo para la identificación de las cepas, básicamente por la carencia de la prueba en el medio.
- Período de captación corto (14 meses), para evaluar los cambios en la distribución de los genotipos (Fenómeno de cambio de tipo)

Agradecimientos





CONCLUSIÓN

Conclusión

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

Discusión-Sensibilidad genotípica de las muestras

No se determinaron secuencias con mutaciones en las posiciones 2063 y 2064 del gen *23s rRNA*, asociadas con resistencia a Macrólidos.

Kawai Y. J Antimicrob Agents
Chemother. 2013 Aug;57(8):4046–9.

- 73% de cepas con mutaciones en gen *23s rRNA*

Diaz M. J Clin Microbiol. 2015
Jan;53(1):124-30

- 10% de cepas con mutaciones en gen *23s rRNA*

Diaz M. J Clin Microbiol. 2015
Jan;53(1):124-30

- No se detectaron cepas con mutaciones

Discusión-Predominio de la variante V2a en la población de estudio

La variante V2a se encontró en una proporción mucho más alta, que la descrita en los reportes previos provenientes de países desarrollados.

- 2% de las muestras fueron clasificadas como Variantes V2a.

Kenri T. Infect Immun. 1999 Sep;67(9):4557–62.

- 19.4% de las muestras fueron clasificadas como Variantes V2a.

Dumke R. J Clin Microbiol. 2006 Jul;44(7):2567–70.

- 26.8% de las muestras fueron clasificadas como Variantes V2a

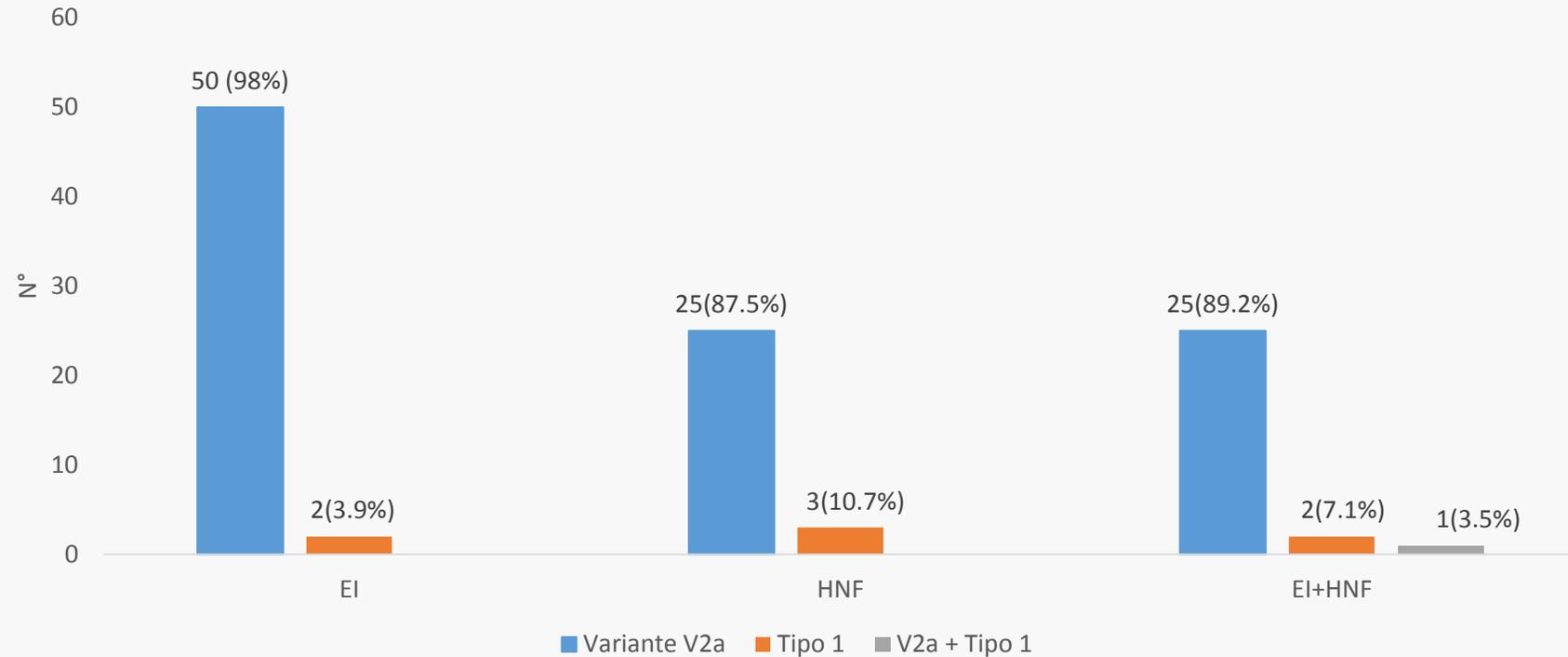
Dumke R. J Clin Microbiol. 2010 Jul;44(7):2567–70.

Resultados- Caracterización genotípica de las muestras mediante el gen *P1*

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

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

Distribución de los genotipos de *M. pneumoniae* en las muestras respiratorias de los niños con NAC, empleando el gen *P1* como marcador molecular



No se evidenció relación entre la variante con la presentación clínica de la neumonía o signos y síntomas particulares de los pacientes.

Dumke. J Clin Microbiol.2010 Jul; 44(7):2567-70

Discusión-correlación con el análisis MLVA

Degrangé S. J Clin Microbiol. 2009 Apr;47(4):914–23.

Desarrolló un análisis MLVA que permitía discriminar las cepas de *M. pneumoniae* en 26 Tipos de acuerdo al perfil de cinco alelos (1,13,14,15,16).

- i) Su desarrollo es costoso.
- ii) Inestabilidad de un alelo (1)

Sun H. PloS One. 2013;8(5):e64607.

Perfil alélico con los cuatro locus restantes (13,14,15,16)

- Díaz M. J Clin Microbiol.2015 Jan; 53(1):124-30
- Dumke R. J Microbiol Methods.2011 Sep; 86(3): 393-6
- Waller J. J Clin Microbiol. 2014 Mar 52(3):849-53

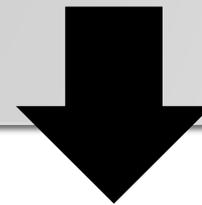
El tipo MLVA 4572 se correlaciona con la distribución del Tipo 1.

Los tipos 3562 y 3662 con el Tipo 2 y las variantes V2a y V2b

Discusión-correlación con el análisis MLVA

Estos resultados se podrían explicar por:

- *M. pneumoniae* posee un genoma homogéneo, con pocas variaciones detectadas en las regiones repetitivas (RepMP1, RepMP2/3, RepMP4, RepMP5).
- Las técnicas que se emplean actualmente para la tipificación de las cepas de *M. pneumoniae* no son lo suficientemente discriminatorias.



- Incluso con una técnica mas discriminatoria como el MLVA no se ha determinado relación entre los Tipos de *M. pneumoniae* con alguna característica clínica de las infecciones causadas por la bacteria.