ARTÍCULO ORIGINAL

Utilidad de la reacción de polimerasa en cadena para la detección de *Mycoplasma pneumoniae* en adultos mayores con neumonía adquirida en la comunidad

M. ANGÉLICA MARTÍNEZ T., YENIFER PINO P.,
TANIA SALAZAR B., ELY JOVER L., CLAUDIA CAROCA C.,
M. ANGÉLICA ESPINOZA N. y LUIS F. AVENDAÑO C.

Diagnostic utility of the polymerase chain reaction for the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* in elderly patients with community-acquired pneumonia

Mycoplasma pneumoniae is a common cause of community-acquired pneumonia (CAP) in children and young adults, but limited information about its prevalence in the elderly is available. The polymerase chain reaction (PCR) with primers targeting the cytaadhesine P1 gene and the 16S rRNA gene was analyzed for detecting *M. pneumoniae* in throat washings of 84 patients, aged 60-96 years, with clinical diagnosis of CAP, from September 2002 through August 2004, in Santiago, Chile. PCR results were compared with serology performed by indirect immunofluorescence (IFI). Specimens from 11 of 84 patients (13.1%) were positive for *M. pneumoniae* by any test. The IFI test was positive in 8 (72.7%) patients and PCR in 7 (63.6%) cases. The acute phase sera allowed diagnosis of *M. pneumoniae* in 5 of 11 patients (45.4%), 4 of them showing an IgM response. PCR was negative in 4 patients with positive serology and 3 patients were positive only by PCR. The two PCR primers showed 100% correlation, and a similar sensitivity; no inhibitory specimens for PCR were detected. In conclusion, *M. pneumoniae* should be considered as a potential etiologic agent of CAP in the elderly. Its detection must be performed by a combination of PCR and serology.

Key words: *Mycoplasma pneumoniae*, Polymerase chain reaction, Pneumonia.

Palabras claves: *Mycoplasma pneumoniae*, Reacción de polimerasa en cadena, Neumonía.

Introducción

Mycoplasma pneumoniae es una causa frecuente de infecciones respiratorias agudas (IRA) altas y bajas, siendo la neumonía una de las manifestaciones clínicas más graves^{1,2}. Aunque *M. pneumoniae* causa infecciones en personas de todas las edades, los niños y los adultos jóvenes son los grupos más frecuentemente afec-

tados¹. Sin embargo, existe escasa información epidemiológica de su impacto en el adulto mayor¹⁻³. El diagnóstico de laboratorio oportuno de esta infección permite confirmar el diagnóstico clínico y ofrecer un tratamiento específico además de conocer su importancia relativa entre las neumonías atípicas y sin impacto epidemiológico.

No obstante, la detección de infección por *M. pneumoniae* por las técnicas clásicas de diagnós-

Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile:

Programa de Microbiología y Micología (MAMT, YPP, TSB)

Programa de Virología (LFAC)

Departamento de Medicina, Hospital Clínico Universidad de Chile (EJL, CCC, MAEN)

Tesis de Licenciatura para Kinesiología (YPP)

Financiamiento: Proyecto AMAYOR 02/1-2, DID n°268. Universidad de Chile.

Recibido: 7 enero 2005

Aceptado: 10 julio 2005

tico como cultivo y fijación del complemento tiene escaso rendimiento, lo que ha dificultado su aplicación clínica y el conocimiento de su verdadera trascendencia como causa de IRA⁴⁻⁸. Entre las técnicas serológicas que se emplea en nuestro país para el diagnóstico serológico de infecciones por *M. pneumoniae* destaca la IFI⁹, técnica sensible y específica, que tiene la ventaja de medir IgM e IgG separadamente¹⁰. Los adultos tienen una menor producción de IgM en respuesta a la infección por *M. pneumoniae* y presentan niveles variables de IgG, como consecuencia de haber experimentado infecciones anteriores, siendo necesario obtener muestras pareadas de suero para observar seroconversión. Estas limitaciones hacen que, en adultos, la serología tenga escasa aplicación clínica pese a su importancia epidemiológica¹¹.

La RPC tiene la virtud de producir resultados en forma específica, sensible y en pocas horas, permitiendo por ello el diagnóstico en la fase aguda de la infección. Aunque se dispone de varios protocolos de RPC para la detección de *M. pneumoniae* son escasos los protocolos que han sido comparados entre sí¹².

El objetivo de nuestro estudio fue comparar la técnica de RPC, empleando dos determinantes genéticos, con la serología para la detección de *M. pneumoniae*, en muestras respiratorias de adultos de 60 años o más, con diagnóstico clínico de NAC.

Materiales y Métodos

Pacientes y muestras clínicas. Se obtuvo muestras clínicas para la detección de *M. pneumoniae* en 84 pacientes ≥ 60 años, atendidos en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile entre septiembre de 2002 y agosto de 2004, con signos y síntomas compatibles con neumonía, y que hubiera sido adquirida en la comunidad. La totalidad de los pacientes mostró una imagen radiográfica pulmonar compatible con neumonía y la mayoría de ellos fueron hospitalizados, cumpliendo los criterios de la *American Thoracic Society* (ATS) para el llamado grupo III de neumonías¹³. Se excluyeron pacientes inmunocomprometidos, en tratamiento inmunosupresor, con tuberculosis o neoplasias, o que hubiesen sido hospitalizados dentro de los 30 días previos al ingreso a este protocolo. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética institucional y los pacientes dieron su consentimiento escrito.

A cada paciente se le tomó, al ingresar al estudio, una muestra de lavado faríngeo con 5 cc

de medio de transporte (Hanks) y 5 cc de sangre sin anticoagulante para serología. Se obtuvo una segunda muestra de suero, 4 a 6 semanas después, en 33 de los 84 (39,3%) pacientes.

Detección de *M. pneumoniae*

Serología. Las muestras de suero fueron procesadas mediante IFI, con el kit comercial Zeus®, E.U.A., de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los sueros positivos para IgM, fueron tratados con reactivo anti IgG (Zorba, Zeus, E.U.A.) para eliminar el posible factor reumatoideo presente en las muestras y luego reevaluados. Se consideró evidencia de infección actual o reciente a la presencia de títulos de IgM $\geq 1:16$, IgG $\geq 1:128$, o al alza en al menos 4 veces el título de IgG en dos muestras pareadas de suero.

Reacción de polimerasa en cadena. Se amplificó el ADN de *M. pneumoniae* con dos pares de partidores: (1) P1A 5'-GCC ACC CTC GGG GGC AGT CAG-3' y P1B 5'- GAG TCG GGA TTC CCC GCG GAG G-3' (2) 16S1 5'- AAG GAC CTG CAA GGG TTC GT -3' y 16S2 5'- CTC TAG CCA TTA CCT GCT AA-3'. Estos partidores reconocen secuencias de los genes de adhesina P1 y 16S rRNA respectivamente^{4,8}. Los partidores generaron fragmentos de amplificación correspondientes a 209 pb para el gen de la adhesina P1 y a 277 pb para el gen 16S rRNA^{4,8}. Las muestras clínicas se procesaron mediante el kit comercial para la extracción de ADN, QIAmp Minikit (QIAGEN, E.U.A.). Las amplificaciones se realizaron en un volumen de 50 μ l conteniendo 2.5 U Taq ADN polimerasa (BioTools, España), 200 μ M de cada nucleótido trifosfato, 2.5 mM MgCl₂ y 1 μ M de cada partidor. Los ciclos de amplificación consistieron en 1 min de denaturación a 94° C, seguido por 40 ciclos de 1 min de denaturación a 94° C, 1 min de hibridación a 65° C y 1 min de extensión a 72° C y un ciclo final de 7 min de extensión a 72° C. Para la amplificación del gen 16S rRNA la temperatura de hibridación fue de 60° C. Las amplificaciones fueron efectuadas en un termociclador MJ Research, Modelo MiniCycler®, E.U.A. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en transiluminador de luz UV. Como patrón de peso molecular se utilizó ADN ladder de 100 pb. Se efectuaron los siguientes controles de calidad del proceso de amplificación: como control positivo se incluyó a la cepa FH de *M. pneumoniae*, la cual fue donada gentilmente por el Prof. Dr. Wolfgang Brecht (Alemania). Como control negativo de la reac-

ción se incluyó un tubo conteniendo todos los reactivos excepto ADN, por cada 8 muestras sometidas a RPC. Para verificar la calidad del ADN y la ausencia de sustancias inhibitorias en las muestras analizadas, se amplificó un fragmento de 326 pb del gen de la β -globina humana, previo a la amplificación del ADN de *M. pneumoniae*⁸. Para el cálculo de la sensibilidad analítica de la RPC se sometieron a RPC diluciones seriadas en H₂O destilada de una muestra de ADN de la cepa FH de *M. pneumoniae*, de concentración conocida (3mM), determinando la mínima cantidad de ADN capaz de amplificar. Para verificar la especificidad analítica de las técnicas de RPC se amplificó el ADN de los siguientes microorganismos: *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma sp*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* grupo *viridans*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis* y *Chlamydia psittaci*.

Definiciones. Se definió como infección por *M. pneumoniae* a un resultado positivo de la serología o de la RPC. Se estimó con *certeza* diagnóstica de infección a un título de IgM $\geq 1:16$ en el suero en fase aguda, o al cambio de 4 veces en el título de IgG en la segunda muestra pareada de suero (seroconversión). Se consideró infección *probable* a un título único o sostenido de IgG $\geq 1:128$, o a la presencia de *M. pneumoniae* en la muestra respiratoria por RPC¹⁴.

Resultados

M. pneumoniae fue detectada mediante serología o RPC en 11/84 pacientes (13,1%) con diagnóstico clínico de NAC. En 7 (63,6%) casos el diagnóstico de infección fue de certeza y en 4 (36,4%) casos se catalogó de probable. La edad promedio de los pacientes fue 74,8 años y 50 de ellos (59,5%) eran mujeres. El 75% de los pacientes en los que se detectó *M. pneumoniae*, tenía una neumonía lobar, y 25% un patrón radiológico de tipo intersticial.

De los 11 pacientes en que se diagnosticó infección por *M. pneumoniae*; la serología fue positiva en 8 (72,7%), mientras que la RPC fue positiva en 7 (63,6%) (Tabla 1).

La serología en la muestra de suero en fase aguda fue positiva en 5 de 11 pacientes (45,4%); en 4 de ellos por la presencia de IgM (36,4%). En sólo 4 pacientes con diagnóstico de infección por *M. pneumoniae* se obtuvo muestras de suero en fase convaleciente y 3 de ellas demostraron seroconversión. En 4 pacientes con serología positiva la RPC fue negativa. La RPC fue positiva en 3 pacientes con serología negativa. Estos 3 casos (27,3%) fueron catalogados como diagnóstico probable de infección por *M. pneumoniae*.

Las dos RPC evaluadas mostraron 100% de correlación, permitiendo la amplificación específica del ADN de *M. pneumoniae*, pero no de los otros microorganismos incluidos. Asimismo, la amplificación del ADN con los dos tipos de

Tabla 1. Criterios diagnósticos empleados en 11 pacientes ≥ 60 años con neumonía adquirida en la comunidad por *Mycoplasma pneumoniae*. Santiago, 2002-2004

Paciente N°	IgM	IgG		RPC-1	RPC-2	Diagnóstico
		1er suero	2° suero			
1	-	< 1:64	ND	+	+	P
2	-	1:32	1:128	+	+	C
3	-	1:128	< 1:64	-	-	P
4	+	1:128	ND	+	+	C
5	-	< 1:64	ND	+	+	P
6	+	< 1:64	ND	+	+	C
7	+	< 1:64	ND	-	-	C
8	-	< 1:64	ND	+	+	P
9	-	1:32	1:128	+	+	C
10	-	1:64	1:256	-	-	C
11	+	1:32	ND	-	-	C

RPC-1: gen de adhesina P1

RPC-2: gen 16S rARN

ND: no determinado P: probable C: certeza

partidores tuvo igual sensibilidad, detectando las mismas muestras positivas. La sensibilidad analítica de las RPC correspondió una capacidad de detección mínima de 7,4 pg de ADN (74×10^{-11} g). No se detectaron muestras con efecto inhibitorio sobre la RPC.

Discusión

Mycoplasma pneumoniae fue detectado en 13,1% pacientes de 60 años o mayor edad, cursando una NAC, sugiriendo que *M. pneumoniae* debe ser también considerado en la etiología de la NAC en este grupo etario. Considerando los criterios actualmente recomendados para el diagnóstico de neumonía, en 63,6% de los casos el diagnóstico de infección por *M. pneumoniae* fue de certeza y en 36,4%, probable¹⁴. Lieberman y cols investigaron mediante serología la etiología bacteriana y viral de la NAC en 346 adultos en Israel. *M. pneumoniae* fue detectado globalmente en 38,2% de los casos, con prevalencia de 14,8 y 13,0% en adultos de 55-64 años y 65-74, respectivamente². Dorigo-Zetsma y cols detectaron *M. pneumoniae* mediante RPC o serología, en 18 (12,5%) de 144 adultos, (edad promedio de 68 años), hospitalizados por NAC en los Países Bajos³.

La serología en fase aguda tiene menor sensibilidad para la detección de *M. pneumoniae* en adultos que en pediatría^{3-4,7,11,15-17}. Se han observado diferencias en la respuesta inmune humoral en pacientes bajo 20 años de edad, comparados con pacientes sobre los 40 años, mostrando estos últimos una disminución en la respuesta mediada por IgM^{11,15-16}. Se ha sugerido que la respuesta en base a IgM es menor en las reinfecciones que en la primoinfección^{11,15-16}. Thacker y Talkington compararon 4 técnicas serológicas comerciales para la detección de IgM en adultos durante un brote de infecciones por *M. pneumoniae*, demostrando 23 a 47% de sensibilidad dependiendo de la técnica empleada⁵. Petitjean y cols compararon cuatro EIA comerciales para la detección de IgG e IgM específicas de *M. pneumoniae* en niños y adultos¹⁷. La detección de IgM en niños alcanzó valores de sensibilidad entre 89 y 92%, mientras que en adultos la sensibilidad del test varió entre 16 y 58%. La sensibilidad de la detección de IgG en adultos en muestras pareadas de suero varió entre 75 y 83%, indicando la utilidad de medir tanto IgM como IgG en este grupo etario¹⁷. Los resultados de nuestro estudio también muestran la infrecuente producción de IgM en adultos mayores

ya que, sólo 4 de 11 pacientes en los cuales se detectó infección por *M. pneumoniae* produjeron esta inmunoglobulina. Por otra parte, no se recomienda utilizar como criterio de diagnóstico para infección por *M. pneumoniae* un título alto de IgG en una muestra único de suero porque su presencia puede deberse a infecciones anteriores¹⁶. Sin embargo, es difícil en la práctica clínica, especialmente en pacientes mayores, obtener una segunda muestra de suero para determinar seroconversión, justificándose de esta forma la investigación de otros procedimientos de diagnóstico.

La sensibilidad de la RPC para detectar *M. pneumoniae* varía entre 65 y 90%, mientras que su especificidad varía entre 90 y 100%, dependiendo del formato y del protocolo de RPC utilizado¹². Se han desarrollado varios protocolos de RPC incluyendo varios blancos para la amplificación del ADN, siendo el gen de la adhesina P1 y el gen 16S rRNA los más frecuentemente usados^{4,6,8,12,17-20}. Los protocolos han sido comparados con el cultivo y la serología demostrando ser más sensibles que el cultivo y complementarios a la serología^{6,8,17}. La RPC ha resultado tener mayor sensibilidad que la serología para la detección de *M. pneumoniae* en pacientes inmunocomprometidos y adultos mayores^{3,18}. En nuestro estudio la RPC fue positiva en 3 pacientes con serología negativa en la fase aguda y en los que no se tomó la segunda muestra de suero, no pudiendo documentar la seroconversión, como tampoco objetivar la condición de portador de *M. pneumoniae* en estos pacientes. Varios grupos han documentado la portación faríngea de *M. pneumoniae* en adultos^{6,21}. Por otra parte, descartamos que estas tres muestras sean falsos positivos. Resultados falsamente positivos en la RPC se generan generalmente por contaminación entre muestras durante su preparación para extraer el ADN y luego en la preparación de las reacciones para RPC. Para descartar contaminación entre las muestras, todas las muestras positivas para RPC fueron repetidas con ADN obtenido de una segunda extracción, independiente de la anterior. La contaminación en la segunda fase fue evitada trabajando en otra habitación, bajo cámara de flujo laminar, con micropipetas de uso exclusivo y puntas protegidas de aerosoles, además de incluir controles negativos en cada reacción.

El aislamiento en medios de cultivo, carece de los problemas de contaminación potencial que presenta la RPC, pero no puede ser empleada como técnica de referencia por su baja sensibilidad. En un estudio efectuado en nuestro país en población pediátrica, Kogan y cols compararon

la sensibilidad del cultivo *versus* la RPC para la detección de *M. pneumoniae* en NAC, encontrando valores de sensibilidad de 61,3 y 90,3% respectivamente, considerando la IFI como técnica de referencia²².

La RPC fue negativa en 4 pacientes con serología positiva. Como descartamos la presencia de inhibidores en las muestras respiratorias, esto podría deberse a pacientes con baja carga microbiana, o a disminución de la carga microbiana por uso de antimicrobianos. Tampoco podemos descartar que las muestras utilizadas en este estudio sean subóptimas para efectuar la RPC de *M. pneumoniae*. Las muestras de lavado faríngeo tienen la ventaja de ser poco invasoras y permiten la detección de otras bacterias atípicas y virus respiratorios por cultivo o RPC. Han demostrado ser más sensibles que las muestras de aspirado nasofaríngeo e hisopado faríngeo, pero su sensibilidad es menor a la muestra de expectoración³. Actualmente estamos tratando de estandarizar la técnica de RPC en muestras de expectoración, para lo cual hemos utilizado N-acetil-L-cisteína que hidroliza la mucina de la muestra. Lamentablemente, y no obstante el uso posterior de sistemas comerciales de extracción del ADN, se observa en algunos casos efecto inhibitorio de la RPC.

Loens y cols revisaron recientemente la literatura científica disponible con relación a las técnicas de amplificación empleadas para la detección de *M. pneumoniae*¹², observando que muchos de los protocolos de RPC empleados no han sido suficientemente evaluados. No observamos en este estudio diferencias en la sensibilidad o en la especificidad de la RPC según el tipo de partidores empleados. Por otra parte, es difícil comparar la sensibilidad y especificidad de las técnicas de RPC utilizadas en distintos estudios, ya que existen diferencias en las muestras clínicas obtenidas, en el protocolo de extracción de ADN, en la cantidad de templado incluido o en el blanco de amplificación escogido. Williamson encontró un mayor número de muestras positivas con partidores para el gen 16S rARN, mientras que Leven y cols encontraron mayor sensibilidad de la RPC con partidores para el gen de la adhesina P1^{4,19}. Nosotros esperábamos encontrar una mayor sensibilidad de la RPC con partidores para el gen de la adhesina P1, ya que este gen está repetido en varias copias, constituyendo el 8,5% del genoma de *M. pneumoniae*, mientras que sólo existen dos operones ribosomales en esta bacteria²³. Probablemente el bajo número de muestras positivas no permitió observar diferencias. Las nuevas técnicas de amplificación de los áci-

dos nucleicos como NASBA (*nucleic acid sequence-based amplification*) y la técnica de hibridación con ADN ramificado (*branched DNA*) basada en la amplificación de la señal generada en el proceso de amplificación del ARN, son técnicas atractivas para evaluar en la detección de *M. pneumoniae*²⁴. Por una parte son intrínsecamente más sensibles que las técnicas de amplificación convencionales al amplificar ARN, presente en un gran número de copias en el genoma de una bacteria y, por otra parte, mediante el empleo de calibradores internos, permiten la medición de la carga microbiana presente en la muestra. Ambas metodologías se emplean en la clínica para la amplificación isotérmica de los ácidos nucleicos y para cuantificar carga viral en pacientes portadores de infección por VIH, VHB y VHC²⁴. Su aplicación la detección de *M. pneumoniae* sería de gran utilidad para distinguir entre portación e infección.

Conclusión

- Existen infecciones por *M. pneumoniae* en NAC de adultos mayores, en nuestro país, como se ha comunicado en el extranjero, tema en que se necesita de mayor estudio.
- La detección de *M. pneumoniae* en NAC de adultos mayores requiere el uso combinado de técnicas serológicas y de RPC para mejorar el diagnóstico en la fase aguda de la infección. No se observaron diferencias en la sensibilidad o especificidad de la RPC según los partidores utilizados, pero el número de muestras positivas para este microorganismo es escaso para obtener conclusiones definitivas.

Resumen

Mycoplasma pneumoniae es una causa frecuente de neumonía adquirida en la comunidad (NAC) en niños y adultos jóvenes, existiendo escasa información de su frecuencia en el adulto mayor. Se analizó la reacción de polimerasa en cadena (RPC) con dos pares de partidores, gen de la adhesina P1 y gen 16S rRNA, para la detección de *M. pneumoniae* en lavado faríngeo de 84 pacientes de 60-96 años con diagnóstico clínico de NAC, desde septiembre de 2002 hasta agosto de 2004. Los resultados de la RPC fueron comparados con los de la serología mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI). Se detectó infección por *M. pneumoniae* mediante serología o RPC en 11 de 84 pacientes (13,1%). La serología fue positiva en 8 (72,7%) y la RPC en 7 (63,6%) muestras. La serología en la muestra de suero en fase aguda

fue positiva en 5 de 11 pacientes (45,4%), en 4 de ellos por la presencia de IgM. En 4 pacientes con serología positiva la RPC fue negativa. En 3 pacientes con serología negativa la RPC fue positiva. Las dos RPC mostraron 100% de correlación y la sensibilidad fue la misma; no se detectaron muestras con efecto inhibitorio de la reacción. En conclusión, *M. pneumoniae* debería ser considerado en la etiología de la NAC en adultos mayores. La detección de este microorganismo debe basarse en el uso combinado de serología y RPC.

Referencias

- 1.- Foy H M. Infections caused by *Mycoplasma pneumoniae* and possible carrier state in different populations of patients. Clin Infect Dis 1993; 17(Suppl 1): S37-S46.
- 2.- Lieberman D, Schlaeffer F, Boldur I, et al. Multiple pathogens in adult patients admitted with community-acquired pneumonia: a one year prospective study of 346 consecutive patients. Thorax 1996; 51: 179-84.
- 3.- Dorigo-Zetsma J W, Verkooyen R P, van Helden H P, van der Nat H, van den Bosch J M. Molecular detection of *Mycoplasma pneumoniae* in adults with community-acquired pneumonia requiring hospitalization. J Clin Microbiol 2001; 39: 1184-6.
- 4.- Ieven M, Ursi D, Van Bever H, Quint W. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by two polymerase chain reactions and role of *M. pneumoniae* in acute respiratory tract infections in pediatric patients. J Infect Dis 1996; 173: 1445-52.
- 5.- Thacker W L, Talkington D F. Analysis of complement fixation and commercial enzyme immunoassays for detection of antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* in human serum. Clin Diag Lab Immunol 2000; 7: 778-80.
- 6.- Waring A L, Halse T A, Csiza C K, Carlyn C J, Arruda Musser K, Limberger R J. Development of a genomics-based PCR assay for detection of *Mycoplasma pneumoniae* in a large outbreak in New York State. J Clin Microbiol 2001; 39: 1385-90.
- 7.- Templeton K E, Sheltinga S A, Graffelman A W, Van Schie J M, Crielaard J W, Sillekens P, et al. Comparison and evaluation of real-time PCR, real-time nucleic acid sequence-based amplification, conventional PCR, and serology for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae*. J Clin Microbiol 2003; 41: 4366-71.
- 8.- Tjhie J H, Van Kuppeveld F J, Roosendaal R, Melchers W J, Gordijn R, MacLaren D M, et al. Direct PCR enables detection of *Mycoplasma pneumoniae* in patients with respiratory tract infections. J Clin Microbiol 1994; 32: 11-6.
- 9.- Navarrete M, Wilson M, Otth L, Hoffmann H, Zoror L. Frecuencia de *Mycoplasma* y *Chlamydia pneumoniae* en pacientes con *distress* respiratorio y serología negativa para hantavirus. Rev Chil Infect 2003; 20: 7-10.
- 10.- Aubert G, Pozzetto B, Gaudin O G, Hafid J, Mbida A D, Ros A. Evaluation of five commercial tests: complement fixation, microparticle agglutination, indirect immunofluorescence, enzyme-linked immunosorbent assay and latex agglutination for *Mycoplasma pneumoniae* serology. Ann Biol Clin (Paris) 1992; 50: 593-97.
- 11.- Sillis M. The limitations of IgM assays in the serological diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections. J Med Microbiol 1990; 33:253-8.
- 12.- Loens K, Ursi D, Goossens H, Ieven M. Molecular diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infections. J Clin Microbiol 2003; 41: 4915-23.
- 13.- Niederman M S, Bass J B, Campbell G D, Fein A M, Grossman R F, Mandell L A, et al. Guidelines for the initial management of adults with community-acquired pneumonia: Diagnosis, assessment of severity and initial antimicrobial therapy. Am Rev Resp Dis 1993; 148: 1418-26.
- 14.- Fernández M, Zagolin M, Ruiz M, Martínez M A, Díaz J C. Neumonía adquirida en la comunidad que se hospitaliza: estudio etiológico. Rev Méd Chile 2003; 131: 498-504.
- 15.- Jacobs E, Bennewitz A, Bredt W. Reaction pattern of human anti-*Mycoplasma pneumoniae* antibodies in enzyme-linked immunosorbent assays and immunoblotting. J Clin Microbiol 1986; 23: 517-22.
- 16.- Uldum S A, Jensen J S, Sondergard-Andersen J, Vuust J, Lind K. Enzyme immunoassay for detection of immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies to *Mycoplasma pneumoniae*. J Clin Microbiol 1992; 30: 1198-204.
- 17.- Petitjean J, Vabret A, Gouarin S, Freymuth F. Evaluation of four commercial immunoglobulin G (IgG)-and IgM-specific enzyme immunoassays for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections. J Clin Microbiol 2002; 40: 165-71.
- 18.- Abele-Horn M, Busch U, Nitschko H, Jacobs E, Bax R, Pfaff F, et al. Molecular approaches to diagnosis of pulmonary diseases due to *Mycoplasma pneumoniae*. J Clin Microbiol 1998; 36: 548-51.
- 19.- Williamson J, Marmion BP, Worswick D A, Kok T W, Tannock G, Herd R, et al. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. Antigen capture and PCR-gene amplification for detection of the mycoplasma: problems and clinical correlation. Epidemiol Infect 1992; 109: 519-37.
- 20.- Ursi J P, Ursi D, Ieven M, Pattyn S R. Utility of an internal control for the polymerase chain reaction: application to detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical specimens. APMIS 1992; 100: 635-9.
- 21.- Gnarpe J, Lundbäck A, Sundelöf B, Gnarpe H. Prevalence of *Mycoplasma pneumoniae* in subjectively healthy individuals. Scan J Infect Dis 1992; 24: 161-64.
- 22.- Kogan R, Martínez M A, Rubilar L, Payá E, Quevedo I, Puppo H, et al. Comparative randomized trial of azithromycin versus erythromycin and amoxicillin for treatment of community-acquired pneumonia in children. Pediatr Pulmonol 2003; 35: 81- 88.
- 23.- Himmelreich R H, Hilbert H, Plagens H, Pirkel E, Li B-L, Herrmann R. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. Nucleic Acid Res 1996; 24: 4420-49.
- 24.- Corbalán A. Biología molecular en Infectología. Parte I: Desarrollo y metodologías. Rev Chil Infect 2002; 19: 14-24.

Correspondencia a:
M. Angélica Martínez Tagle
mamartin@med.uchile.cl