



CIENCIAS BIOMÉDICAS

Artículo Original de Investigación

Evidencias de infecciones por *Mycoplasma pneumoniae* en Cuba

Nadia María Rodríguez Preval ¹ <https://orcid.org/0000-0002-1921-2527>
Brian Arturo Mondeja Rodríguez ¹ <https://orcid.org/0000-0001-6196-3570>
Carlos Pablo Dotres Martínez ² <https://orcid.org/0000-0003-0355-6461>
Ruxana Sardiñas Morales ¹ <https://orcid.org/0000-0002-1110-5460>
Dania Vega Mendoza ² <https://orcid.org/0000-0002-3082-1104>
Carmen Fernández Molina ¹ <https://orcid.org/0000-0001-7496-023X>
Odalys Valdés Ramírez ¹ <https://orcid.org/0000-0001-9352-488X>
Lilia María Ortega González ¹ <https://orcid.org/0000-0003-0497-5537>
Odalys Marrero Martínez ¹ <https://orcid.org/0000-0002-7870-1304>

¹ Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK). La Habana, Cuba

² Hospital Pediátrico Juan M. Márquez. La Habana, Cuba

* Autor para la correspondencia: nadia@ipk.sld.cu

Revisores^a

Reinaldo Villaescusa Blanco
Instituto de Hematología e Inmunología.
La Habana, Cuba

Editor

Amanda Gómez Bahamonde
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba

Traductor

Yoan Karell Acosta González
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba

^a N. del E.: En este apartado figuran los nombres de los árbitros que accedieron a revelar su identidad, como expresión de apertura progresiva del proceso de revisión por pares. No aparecen aquellos que optaron por el anonimato

RESUMEN

Introducción. *Mycoplasma pneumoniae* constituye una causa frecuente de infecciones del tracto respiratorio en humanos, y en menor frecuencia, se describen infecciones extrapulmonares. En Cuba el diagnóstico de *Mycoplasma pneumoniae* solo se realiza en el Laboratorio Nacional de Referencia de *Micoplasmas* (LNR-M) del IPK, y hasta el año 2012 solo se habían realizado 2 estudios donde se detectó esta especie. **Métodos.** Se implementaron métodos para el diagnóstico de *Mycoplasma pneumoniae*, la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana, así como para la detección molecular de resistencia antimicrobiana. Se realizaron estudios descriptivos para la detección de *Mycoplasma pneumoniae* en pacientes con sintomatología respiratoria, de los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de aislados clínicos, la detección de resistencia a macrólidos a partir de muestras clínicas positivas, y la detección de genotipos de *Mycoplasma pneumoniae*. **Resultados y Discusión.** Se detectó *Mycoplasma pneumoniae* en el 5,2 % de pacientes con Infección Respiratoria Aguda Grave y Enfermedad Tipo Influenza, todos negativos a virus respiratorios. Se demostró *Mycoplasma pneumoniae* en el 25,8 % de niños con síndrome coqueluchoide, el 23 % de niños con neumonía intersticial y el 60 % de niños con asma no controlada. Se demostró por primera vez en Cuba la resistencia a macrólidos en *Mycoplasma pneumoniae*, detectándose en un 22,5 %, y se confirmó mediante la demostración de los mecanismos moleculares asociados. Se describieron los genotipos de *Mycoplasma pneumoniae* circulantes en el país, identificándose 5 secuencias tipo nuevas. Se concluyó que estas evidencias científicas confirman el papel patogénico de esta especie y sugieren la necesidad de una vigilancia activa.

Palabras clave: *Mycoplasma pneumoniae*; infección respiratoria; resistencia antimicrobiana



Evidence of *Mycoplasma pneumoniae* infections in Cuba

ABSTRACT

Introduction. *Mycoplasma pneumoniae* is a common cause of respiratory tract infections in humans and, less frequently, extrapulmonary infections are described. In Cuba, the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* is only done in the National Reference Laboratory of Mycoplasmas (NRL-M) at IPK and, until 2012, this species had only been detected in 2 studies. **Methods.** Methods were implemented for the *Mycoplasma pneumoniae* diagnosis, the antimicrobial susceptibility determination, and the antimicrobial resistance molecular detection. Descriptive studies were conducted for the *Mycoplasma pneumoniae* detection in patients with respiratory symptomatology, for the antimicrobial susceptibility patterns of clinical isolates, the macrolide resistance detection in positive clinical samples, and the detection of *Mycoplasma pneumoniae* genotypes. **Results and Discussion.** *Mycoplasma pneumoniae* was detected in 5.2 % (96/1836) of patients with Severe Acute Respiratory Infections and Influenza-like illness, all negative to respiratory virus. *Mycoplasma pneumoniae* was demonstrated in 25.8 % (31/120) of children with coqueluchoid syndrome, 23 % (17/74) of children with interstitial pneumonia, and 60% (9/15) of children with non-controlled asthma. The macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* was showed in Cuba for the first time, detected in a 22.5%, and confirmed by the demonstration of the associated molecular mechanisms. The *Mycoplasma pneumoniae* genotypes circulating in the country were described and 5 new sequence types were identified. It was concluded that these pieces of scientific evidence support the pathogenic role of this species and suggest the necessity of an active surveillance.

Keywords: *Mycoplasma pneumoniae*; respiratory infections; antimicrobial resistance

INTRODUCCIÓN

Mycoplasma pneumoniae ha constituido una causa frecuente de infecciones del tracto respiratorio en humanos, ha incluido bronquiolitis, faringitis, síndrome *coqueluchoide*, asma y neumonía intersticial, las cuales han sido más frecuentes en niños en edad escolar. ^(1,2) Igualmente, aunque con menor frecuencia se han descrito infecciones extrapulmonares. ^(3,4) Las tetraciclinas, fluoroquinolonas y macrólidos han sido los antimicrobianos efectivos para el tratamiento de *Mycoplasma pneumoniae* y han constituido los macrólidos el tratamiento de elección. ⁽⁵⁾ Los aislados clínicos de *Mycoplasma pneumoniae* resistentes a macrólidos se informaron por primera vez en la década de 1990 y desde entonces aumentó dramáticamente su incidencia de forma variable en diferentes regiones geográficas. Esta resistencia obedeció principalmente a mutaciones puntuales en posiciones específicas del dominio V del gen del ARNr 23S. ⁽⁶⁾ En contraste, la resistencia a quinolonas y tetraciclinas en aislados clínicos de *Mycoplasma pneumoniae* no se ha descrito hasta el presente. ^(7,8) La genotipificación de *Mycoplasma pneumoniae* ha sido necesaria para entender la transmisión de la infección y la diseminación de la resistencia antimicrobiana y para ello se han desarrolla-

do diversos métodos que han permitido la caracterización de aislados, así como directamente a partir de muestras clínicas positivas a *Mycoplasma pneumoniae*. ^(9,10,11)

En Cuba el diagnóstico de *Mycoplasma pneumoniae* solo se realizó en el LNR-M del IPK y hasta el año 2012 solo se habían realizado 2 estudios en pacientes con sintomatología respiratoria donde se detectó esta especie en un 13 %. ⁽¹²⁾ El objetivo de este trabajo fue obtener evidencias de la infección por *Mycoplasma pneumoniae* en pacientes con sintomatología respiratoria.

MÉTODOS

En el LNR-M del IPK (LNRE-IPK) se realizaron diversos estudios en el período 2012-2017 para el estudio de las infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*. Para ello se implementaron 2 PCR a punto final y una RT-PCR para la amplificación de fragmentos del gen de la proteína de adhesión de *Mycoplasma pneumoniae*, siguiendo la metodología descrita por Jensen *et al.* en 1989 y 1992. ⁽¹³⁾ Estas PCR se evaluaron con extractos de ADN de las cepas de referencia de *Mycoplasma pneumoniae* MAC (ATCC 15492) y se realizaron por triplicado en días alternos para evaluar la reproducibilidad de los resultados.

Igualmente, se implementó la técnica de microdilución en caldo para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de azitromicina, eritromicina, tetraciclina, levofloxacina y moxifloxacina en aislados de *Mycoplasma pneumoniae* siguiendo la metodología descrita en las normas de la CLSI para micoplasmas.⁽¹⁴⁾ Se utilizaron como controles de la prueba la cepa de referencia: *Mycoplasma pneumoniae* ATCC 29432, sensible a todos los antimicrobianos en estudio y recomendada por las CLSI, así como la cepa de referencia: *Mycoplasma pneumoniae* M6696, resistente a macrólidos. Por otra parte, se realizó la transferencia tecnológica de la PCR anidada para la amplificación parcial del gen del ARNr 23S, descrita por Dumke R et. al.⁽⁸⁾ en 2010 y la consiguiente secuenciación para la detección de mutaciones puntuales asociadas a la resistencia a macrólidos a partir de muestras positivas a *Mycoplasma pneumoniae*.

Se realizaron estudios descriptivos durante los años 2012 al 2017 para la detección de *Mycoplasma pneumoniae* en pacientes con sintomatología respiratoria, que incluyeron: el análisis de 1836 muestras clínicas de pacientes con sintomatología respiratoria recibidas durante el período de estudio en el LNR-M, y que fueron negativas a virus respiratorios y el estudio de muestras clínicas de 224 pacientes pediátricos atendidos en el Hospital Pediátrico Universitario Juan Manuel Márquez que incluían 120 niños con diagnóstico de síndrome coqueluchoide, 74 niños con neumonía intersticial, 30 pacientes asmáticos que fueron remitidas al LNR-M del IPK para su diagnóstico.

Posteriormente se realizó el estudio de 21 aislados clínicos provenientes de pacientes en edad pediátrica y 19 muestras clínicas positivas a *Mycoplasma pneumoniae* provenientes de pacientes adultos, para la detección de la susceptibilidad antimicrobiana mediante la microdilución en caldo, así como para la detección de resistencia antimicrobiana directamente a partir de las muestras clínicas, respectivamente.

Se determinaron los genotipos de *Mycoplasma pneumoniae* siguiendo la metodología descrita por Dumke R et. al.⁽⁹⁾ en 2006 para la amplificación de fragmentos del elemento repetitivo repMp2/3, localizado en la proteína de adhesión P1 de *Mycoplasma pneumoniae*, y la amplificación de un fragmento del elemento repetitivo repMp4. Igualmente, se determinaron los genotipos de *Mycoplasma pneumoniae* mediante la técnica de MLVA siguiendo la metodología descrita por Dumke R et. al. en 2011⁽¹⁰⁾ y Chalker VJ et. al.⁽¹¹⁾ en 2015 para la determinación del número de secuencias repetidas en los 4 locus recomendados. Adicionalmente, se determinaron las secuencias tipo de *Mycoplasma pneumoniae* mediante la técnica de MLST siguiendo la metodología descrita por Brown RJ et. al.⁽¹⁵⁾ en 2015 para la detección de polimorfismos en las secuencias de 8 genes constitutivos.

Finalmente se analizaron muestras clínicas de humor vítreo y del estuche comercial ARI WELL D-One de un paciente pediátrico con infección ocular, remitidas del Hospital Pediátrico Juan Manuel Márquez en el año 2018 para la confirmación de *Mycoplasma pneumoniae*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El límite de detección de las PCR a punto final implementadas fue de 5 geq de *Mycoplasma pneumoniae* por reacción, mientras que la RT-PCR tuvo un límite de detección de 1 geq de *Mycoplasma pneumoniae* por reacción. Estos resultados permitieron proponer dichos métodos como herramientas de diagnóstico de infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*, considerando que esta bacteria se podía encontrar en concentraciones de hasta 10 geq/ μ l en las muestras respiratorias, por lo que ha sido necesario contar con ensayos diagnósticos de alta sensibilidad.

Se corroboraron los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de referencia utilizadas para la implementación de la técnica de microdilución en caldo, lo que confirmó la reproducibilidad del método de referencia. Se demostró además la utilidad y precisión de la metodología transferida para la detección de mutaciones puntuales asociadas a la resistencia a macrólidos en *Mycoplasma pneumoniae*.

Se detectó *Mycoplasma pneumoniae* en el 5,2 % (96/1836) de las muestras clínicas provenientes de paciente adultos con sintomatología respiratoria. Estas provenían de pacientes adultos con IRA grave (58) y enfermedad tipo influenza (37). Los pacientes pertenecían a ambos sexos y correspondieron a 12 provincias del país. Resultados similares se informaron en estudios publicados previamente donde se demostró un 6,3 % de pacientes con IRA grave positivos a *Mycoplasma pneumoniae*, así como un 3,57 % de positividad a *Mycoplasma pneumoniae* en pacientes con síntomas respiratorios.^(16,17) De manera similar, Martínez et. al.⁽¹⁸⁾ demostraron que el 6,44 % de los pacientes hospitalizados con IRA grave fueron positivos a *Mycoplasma pneumoniae*.

Al analizar la positividad a *Mycoplasma pneumoniae* en ambos sexos, en este estudio no se encontraron diferencias significativas. El 46 % correspondió al sexo femenino, mientras que el 54 % correspondió al sexo masculino. Estos resultados han coincidido con los descritos en la literatura, donde se ha observado que no existen diferencias significativas entre la frecuencia de positividad a *Mycoplasma pneumoniae* entre ambos sexos.^(19,20)

Las muestras positivas a *Mycoplasma pneumoniae* obtenidas en el estudio provenían de pacientes de casi todas las provincias del país, excepto Pinar del Río, Cienfuegos, Las Tunas y Granma. No existen hasta el momento publicaciones

sobre la prevalencia de *Mycoplasma pneumoniae* en el país, por lo cual este estudio ha constituido el primer reporte sobre la frecuencia de positividad de este microorganismo en el país. En la provincia de La Habana se observó un mayor número de casos positivos, lo cual pudo deberse a que esta provincia fue la que remitió un mayor número de muestras al IPK, además de ser la de mayor densidad poblacional.

El 25,8 % (31/120) de las muestras clínicas de los pacientes con síndrome *coqueluchoide* fueron positivas a *Mycoplasma pneumoniae*. Este síndrome ha podido tener varias causas infecciosas y dentro de las cuales han estado las producidas por *Mycoplasma pneumoniae*. La variación en la detección de este patógeno ha podido estar relacionada con la mayor o menor sospecha en cuadros clínicos atípicos o graves con la presencia de infecciones mixtas, lo que ha hecho que *Mycoplasma pneumoniae* en algunos casos sea subestimada.

Por otro lado, se detectó *Mycoplasma pneumoniae* en el 23 % (17/74) de los niños con neumonía intersticial. En este grupo de pacientes fue mayor el número de casos positivos en el rango de edades comprendidas entre 1 a 5 años. *Mycoplasma pneumoniae* se consideró responsable del 4 al 8 % de las neumonías bacterianas adquiridas en la comunidad durante los períodos de endemicidad, y hasta de un 70 % en las poblaciones cerradas. (21,22) Esta proporción ha variado de acuerdo a la edad, han sido los niños en edad escolar y los adolescentes los grupos etarios más afectados. (23) Los resultados obtenidos en este estudio han sido similares a los reportados por otros autores, quienes indicaron que *Mycoplasma pneumoniae* presentaba una alta prevalencia en el tracto respiratorio de niños menores de 5 años. (24,25)

De los 30 pacientes estudiados clasificados como asmáticos moderados persistentes, 15 presentaban criterio de no controlados, de los cuales 9 resultaron positivos a *Mycoplasma pneumoniae* (60 %), mientras que los 15 pacientes asmáticos controlados fueron negativos. *Mycoplasma pneumoniae* y otras bacterias atípicas han sido implicadas por largo tiempo en la patogénesis del asma (26) Se sugirió que el proceso patogénico de esta bacteria en el asma bronquial fuera multifactorial, donde la infección en individuos con predisposición atópica y con respuestas inflamatorias genéticamente determinadas, diera lugar a las manifestaciones en relación con el asma. Hay datos que confirman que *Mycoplasma pneumoniae* ha podido estar presente y persistir durante meses en el aparato respiratorio de individuos sanos y en asmáticos. Donde esta infección ha persistido se ha relacionado con la producción de citoquinas proinflamatorias que han contribuido a la respuesta inflamatoria asmática. (27,28)

Por otro lado, se ha descrito que *Mycoplasma pneumoniae* ha provocado inflamación, obstrucción bronquial, hipereactividad y deterioro de la función pulmonar. (29) En un estu-

dio prospectivo, Biscardi *et al.* (30) se reportó una incidencia de infección por *Mycoplasma pneumoniae* del 50 % en niños con una primera crisis de asma y del 20 % en niños asmáticos con episodio de reagudización. Además, los niños con infección por *Mycoplasma pneumoniae* en su primera crisis asmática tenían mayor tasa de recurrencia de sibilancias que los niños que no presentaban la infección. (30,31)

El 100 % de los pacientes estudiados con síndrome *coqueluchoide* y neumonía intersticial que llevaron tratamiento con azitromicina tuvieron buena respuesta al tratamiento sin presentar reacciones adversas ni complicaciones. En relación con los asmáticos no controlados positivos a *Mycoplasma pneumoniae*, 7 de ellos pasaron a criterios de controlados después del tratamiento y se mantuvieron con mal control 2 de ellos. Se planteó que en la infección por *Mycoplasma pneumoniae* la duración de los síntomas y signos suelen ser más cortos si se instaura tratamiento antimicrobiano al comienzo de esta y se disminuye la frecuencia de recurrencia de la infección y de episodios de sibilancias. El inicio temprano del tratamiento ha disminuido el riesgo de alteraciones posteriores de la capacidad de difusión pulmonar. Existen estudios que han demostrado que el uso de azitromicina profiláctica ha disminuido la tasa de transmisión y la aparición de síntomas. (32-34) Teniendo en cuenta estos criterios, los pacientes estudiados cumplieron tratamiento con azitromicina por 5 días, así como tratamiento profiláctico en el caso de los asmáticos no controlados, con una evolución favorable. En relación con los asmáticos no controlados, el 77,7 % de ellos pasaron a controlados después del tratamiento y quedaron 2 pacientes con criterios de no controlados, por no adhesión al tratamiento intercrisis.

De esta manera se mostraron evidencias que han permitido concluir que *Mycoplasma pneumoniae* es un patógeno a tener en cuenta en la expresión clínica de la enfermedad respiratoria en pediatría en nuestro medio, lo que ha sugerido la necesidad de incluir este patógeno en la vigilancia microbiológica de las IRA.

A través del método de microdilución en caldo se demostraron 4 aislados resistentes a macrólidos entre los 21 estudiados (19,5 %), con valores de CMI \geq 64 μ g/mL para cada uno. Todos los aislados fueron sensibles para el resto de los antimicrobianos analizados. Al analizar los fragmentos amplificados del gen del ARNr23S de los aislados clínicos de *Mycoplasma pneumoniae* se confirmaron los 4 aislados demostrados resistentes por el método de CMI. En 2 de ellos se demostró la mutación A2063G y en los otros 2 la mutación A2064G. A su vez, en las 19 muestras clínicas positivas a *Mycoplasma pneumoniae* se identificaron 5 que contenían la mutación A2063G.

Se demostró una frecuencia de resistencia a macrólidos de 22,5 %, resultado que coincidió con la reportada por un estudio realizado en Italia en 2019, donde el 20 % de las muestras positivas a *Mycoplasma pneumoniae* mostraron resistencia a macrólidos, todas procedientes de pacientes adultos con neumonía adquirida en la comunidad. ⁽³⁵⁾ Otro estudio realizado en Korea refirió un valor de resistencia a macrólidos similar (17,6 %), el cual incluyó muestras positivas a *Mycoplasma pneumoniae* recuperadas de pacientes pediátricos con infección respiratoria. ⁽³⁶⁾ Poco se ha conocido sobre la situación de la resistencia en *Mycoplasma pneumoniae* en América del Sur y el Caribe, solo ha existido el antecedente de un estudio realizado en Colombia en el 2018 en niños hospitalizados con neumonía adquirida en la comunidad, en el que no se demostró resistencia a macrólidos. ⁽³⁷⁾ De manera general han sido bajos los por cientos de resistencia que se han reportado en países europeos: 0,8 % en Eslovenia, 1,6 % en Dinamarca, 3,6 % en Alemania y 0,2 % en Suecia. ⁽³⁸⁻⁴¹⁾ En contraste, en los países asiáticos se han advertido los porcentajes de resistencia a macrólidos más elevados: 94,8 % y 88,3 % en China; 87,2 % y 81,6 % en Corea y Japón, respectivamente. ⁽⁴²⁻⁴⁵⁾

La demostración en el presente estudio de la mutación A2063G como la más frecuente (77,8 %), detectada en el dominio V del gen del ARNr 23S ha coincidido con lo observado en varios estudios realizados en China, Japón, Canadá y Estados Unidos. ^(43,45-48)

En el presente estudio la genotipificación de *Mycoplasma pneumoniae* con base en la secuencia del gen de la proteína P1 permitió identificar 4 subtipos diferentes (1, 2, V2a y V2c) dentro de los cuales, el subtipo 1 resultó el más frecuente, detectándose en un 57,5% (figura 1, sección A). Este resultado coincidió con lo reportado por 2 estudios realizados en China en pacientes pediátricos y adultos mayores con infecciones respiratorias. ^(44,46) También en Eslovenia el subtipo 1 se reportó como el más frecuente a partir del estudio de muestras de pacientes con diversas infecciones del tracto respiratorio alto y bajo, así como en Estados Unidos, tras el análisis de los datos de un amplio número de aislados y muestras clínicas de pacientes con diferentes infecciones respiratorias durante 8 años de estudio. ^(38,48) En contraste, los 2 únicos estudios precedentes realizados en la región de Latinoamérica han coincidido en demostrar el subtipo 2 como el más frecuente. El primero de ellos, desarrollado en Chile notificó un 78,3 % del

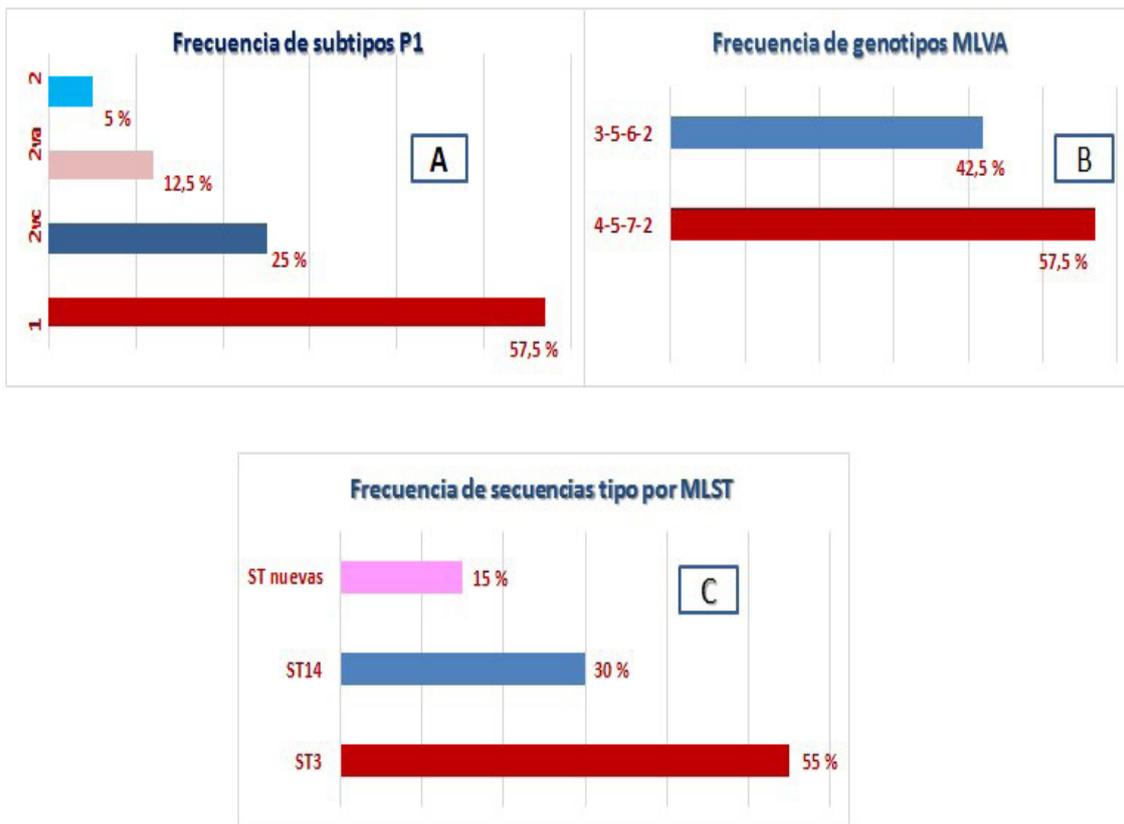


Fig. 1. A) Frecuencia de subtipos P1, B) genotipos MLVA y C) secuencias tipo por MLST de *Mycoplasma pneumoniae*, LNR-M, Cuba (2012-2017).

subtipo 2 al estudiar 23 muestras recuperadas durante el período 2005-2006 a partir de adultos con neumonía adquirida en la comunidad. ⁽⁴⁹⁾ El otro estudio se realizó en Medellín, Colombia durante el período 2012-2013 e informó este mismo subtipo en el 96,1 % de las muestras de esputo y en el 89,3 % de las muestras de exudado nasofaríngeo de 73 niños con diagnóstico de neumonía adquirida en la comunidad. ⁽³⁷⁾

Las diferencias entre los resultados de ambos estudios con las observaciones en Cuba podrían obedecer a que estos autores solo analizaron uno de los elementos repetitivos que se consideró determinante en la diversidad genética con base en el análisis de la proteína P1.

Por otra parte, la genotipificación de *Mycoplasma pneumoniae* empleando la técnica de MLVA permitió la detección de 2 genotipos diferentes (4-5-7-2 y 3-5-6-2) (figura 1, sección B). Esta metodología que se ha fundamentado en el análisis de 4 locus, luego de su estandarización en el 2015 se ha convertido actualmente la más utilizada. Con su empleo durante los últimos 10 años se han demostrado los genotipos 4-5-7-2, 3-5-6-2 y 3-6-6-2 como los más comunes en América del Norte, Asia y Europa. ^(50-52,41) También se ha demostrado una correlación entre los genotipos MLVA y los demostrados para P1. De manera general los aislados con el genotipo 4-5-7-2 han coincidido con el subtipo 1, mientras que los genotipos 3-5-6-2 y 3-6-6-2 han coincidido con el subtipo 2 tal y como se observó en el presente estudio. ^(42,46,48,53,54)

Al combinar los resultados de ambas metodologías de genotipificación de *Mycoplasma pneumoniae* no se observó relación entre la resistencia antimicrobiana y un genotipo P1/MLVA específico. Los intentos por demostrar una asociación entre genotipos específicos de *Mycoplasma pneumoniae* y resistencia a macrólidos no han arribado a conclusiones definitivas, en lo que influyó la diferencia en la frecuencia de esta resistencia en los países en los que se han conducido los estudios. Por ejemplo, en Estados Unidos y Europa donde la incidencia de resistencia a macrólidos se ha presentado $\leq 10\%$ y donde el subtipo 1 de la proteína P1 y MLVA 4-5-7-2 fueron los más comunes, no se ha encontrado asociación y se detectaron otros genotipos también responsables de este fenómeno. ^(38,48) Mientras tanto, en China y Taiwán –países con mayor incidencia de resistencia a macrólidos– se confirmó una asociación de la resistencia con el genotipo MLVA 4-5-7-2. ^(43,44,55,56)

Finalmente, el análisis mediante MLS permitió la identificación de 7 STs (figura 1, sección C). La ST3 fue la más frecuente (55 %; 22/40) seguida de la ST14 (30 %; 12/40) y 5 secuencias que no habían sido reportadas anteriormente, una de ellas se demostró para 2 casos y el resto diferentes de esta y entre sí. Las ST3 y ST14 se identificaron tanto en *Mycoplasma pneumoniae* sensibles como resistentes a ma-

crólidos, mientras que las ST nuevas solo se detectaron en aislados y muestras sensibles.

La demostración en el presente estudio de la ST3 como la más frecuente coincidió con lo reportado por los 2 únicos estudios publicados al respecto. Este es el caso de un estudio en Corea y Japón en los que se identificó la ST3 como la más frecuente, la ST14 en segundo lugar y otras ST en menor proporción y destacó la relación entre el subtipo 1 de la proteína P1 y el CC1, así como entre el subtipo 2 y sus variantes de la proteína P1 y el CC2. ^(57,58) En estos estudios la ST14 se reconoció asociada al CC2 que aún no había sido identificada en el momento en que Brown RJ *et. al.* en el 2015 ⁽¹⁵⁾ publicaron sus resultados. En el presente estudio los aislados y muestras clínicas que contenían la ST3 se correspondieron con el genotipo MLVA 4-5-7-2, mientras que los que contenían la ST14 se correspondieron con el genotipo MLVA 3-5-6-2. Las ST nuevas identificadas se correspondieron con aislados y muestras clínicas que contenían ambos genotipos.

Las ST identificadas en el estudio se agruparon en 2 complejos clonales. El CC1 incluyó la ST3 y una ST nueva, diferente de esta en un solo alelo. El CC2 aglutinó la ST14 y el resto de las ST nuevas, 2 de ellas diferentes de esta en un solo alelo y las otras 2 diferentes en 2 alelos (figura 2).

En resumen, en el presente estudio se corroboró al mismo tiempo la correlación entre las ST que correspondían al genotipo MLVA 4-5-7-2 y el CC1 y entre las ST que correspondían al genotipo MLVA 3-5-6-2 y el CC2. No obstante a que la técnica de MLST es más cara y laboriosa, se constató en esta investigación su gran valor como herramienta de genotipificación de *Mycoplasma pneumoniae*, con un mayor índice de discriminación que las metodologías más utilizadas. En resumen, a través de las 3 metodologías utilizadas se demostró la diversidad genética de *Mycoplasma pneumoniae* en Cuba.

Finalmente, se confirmó en las muestras clínicas analizadas provenientes del paciente pediátrico con infección ocular el diagnóstico de *Mycoplasma pneumoniae*. El RT-PCR fue positivo en ambas muestras y se observaron las colonias características de *Mycoplasma pneumoniae* en el cultivo bacteriológico, confirmándose el resultado. Posteriormente se inició el tratamiento con levofloxacina, uno de los antimicrobianos recomendados para el tratamiento de las infecciones por micoplasmas, obteniéndose una eliminación satisfactoria de la infección luego de 14 días de tratamiento.

Mycoplasma pneumoniae ha sido detectado causando infecciones oculares, pero hasta el momento este es el primer reporte en Cuba de una infección ocular severa por *Mycoplasma pneumoniae*, causando pérdida de un ojo. Otras investigaciones internacionales publicadas han detectado que *Mycoplasma pneumoniae* ha causado conjunctivitis, uveítis y perineuritis y ha establecido asociaciones entre las infecciones por micoplasmas y estas enfermedades. ^(59,60)

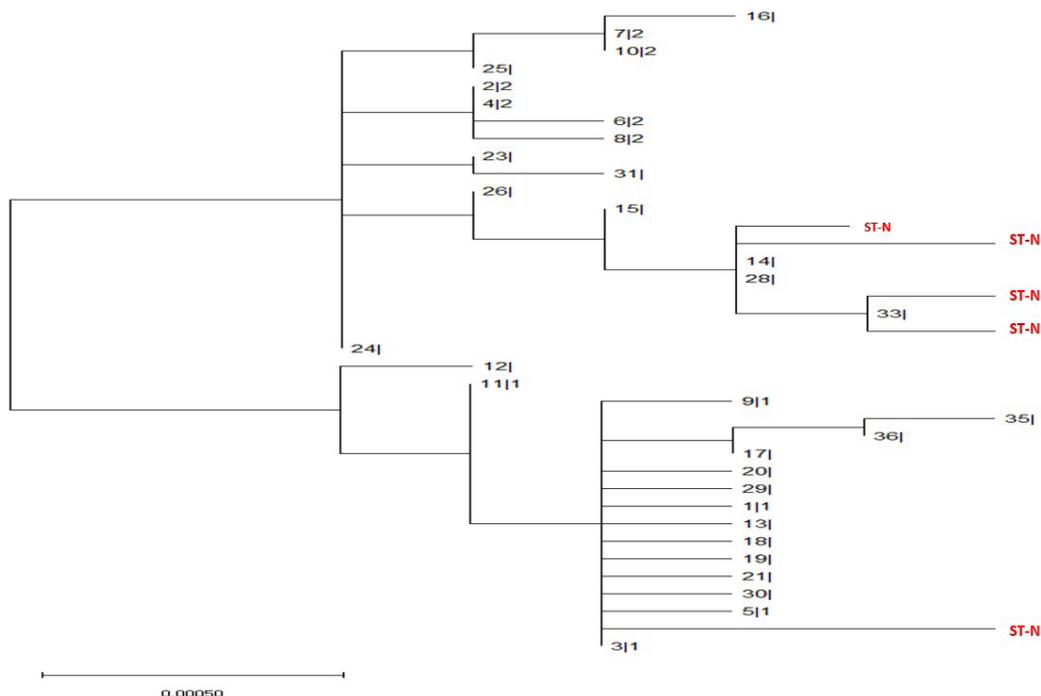


Fig. 2. Árbol filogenético de máxima verosimilitud construido con el programa Mega 6 de las secuencias tipos de *Mycoplasma pneumoniae* obtenidas mediante MLST.LNR-M, Cuba (2012-2017).

Conclusiones

El conjunto de resultados mostrados en este trabajo permitió el fortalecimiento de las capacidades del LNR-M del IPK para el estudio integral de las infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*. La detección de *Mycoplasma pneumoniae* en niños y adultos con sintomatología respiratoria ha constituido una evidencia del papel que ha desempeñado este patógeno en las infecciones respiratorias agudas. La detección de *Mycoplasma pneumoniae* resistente a macrólidos por primera vez en el país constituyó una alerta a las autoridades nacionales de Salud Pública. La descripción por primera vez de la diversidad genética de *Mycoplasma pneumoniae* permitió reportar secuencias tipos no descritas a nivel internacional. Además, la descripción por primera vez en Cuba de un caso de infección extrapulmonar causada por *Mycoplasma pneumoniae* confirmó la asociación de este patógeno con infecciones extrapulmonares. Estas evidencias científicas han demostrado el papel patogénico de esta bacteria y han sugerido la necesidad de una vigilancia activa de este patógeno respiratorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Jacobs E, Ehrhardt I, Dumke R. New insights in the outbreak pattern of *Mycoplasma pneumoniae*. *Int J Med Microbiol* 2015; 305: 705-708.
- Waites KB, Xiao L, Liu Y, Balish MF, Atkinson TP. *Mycoplasma pneumoniae* from the respiratory tract and beyond. *Clin Microbiol Rev.* 2017; 30 (3): 747-809.
- Canavan TN, Mathes EF, Frieden I, Shinkai K. *Mycoplasma pneumoniae*-induced rash and mucositis as a syndrome distinct from Stevens-Johnson syndrome and erythema multiforme: a systematic review. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2015; 72: 239-245. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2014.06.026>
- Narita M. Classification of extrapulmonary manifestations due to *Mycoplasma pneumoniae* infection on the basis of possible pathogenesis. *Front Microbiol.* 2016; 7: p.23.
- Parrott GL, Kinjo T, Fujita J. A Compendium for *Mycoplasma pneumoniae*. *Front Microbiol.* 2016; 7. p.513.
- Bébéar C, Pereyre S, Peuchant O. *Mycoplasma pneumoniae*: susceptibility and resistance to antibiotics. *Future Microbiol* 2011; 6(4): 423-431.
- Pereyre S, Goret J, Bebear C. *Mycoplasma pneumoniae*: current knowledge on Macrolide resistance and treatment. *Front Microbiol.* 2016; 7: 974.
- Dumke R, von Baum H, Lück PC, Jacob, E. Occurrence of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains in Germany. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16: 613-6.
- Dumke R., Lück PC, Noppen C, Schaefer C, von Baum H, Marre R *et al.* Culture independent molecular subtyping of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples. *J Clin Microbiol* 2006;44:2567-70.
- Dumke R, Jacobs E. Culture-independent multi-locus variable number tandem-repeat analysis (MLVA) of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Microbiol Methods* 2011;86:393-6.
- Chalker VJ, Pereyre S, Dumke R, Winchell J, Khosla P, Sun H *et al.* International *Mycoplasma pneumoniae* typing study: interpretation of *M. pneumoniae* multilocus variable number tandem-repeat analysis. *New Microbes New Infect* 2015;7:37-40.

12. Acosta S, Fernández C, Toledo H. *Mycoplasma spp.* en pacientes VIH/SIDA con síntomas respiratorios. *Revista de Ciencias Médicas La Habana.* 2002; 8(2).
13. Jensen JS. Direct detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples. An acute phase diagnostic test. Faculty of Medicine, University of Copenhagen. Thesis. 1992.
14. CLSI [Internet]. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing for Human Mycoplasmas; Approved Guidelines. CLSI document M43-A. Wayne PA.
15. Brown RJ, Holden MT, Spiller OB, Chalker VJ. Development of a multilocus sequence typing scheme for molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 2015;53:3195-203.
16. Henderson KC, Sheppard ES, Betancourt OR, Choi JY, Dluhy RA, Thurman K.A *et al.* The multivariate detection limit for *Mycoplasma pneumoniae* as determined by Nanorod ArraySurface Enhanced Raman Spectroscopy and comparison with limit of detection by qPCR. *Analyst* 2014;139(24):6426–6434.
17. Nilsson AC, Bjorkman C, Welinder-Olsson AW, Persson K. Clinical severity of *Mycoplasma pneumonia* (MP) infection is associated with bacterial load in oropharyngeal secretions but not with MP genotype. *BMC Infect Dis.* 2010;10:39.
18. Martínez MA, Ruiz M, Zunino E, Luchsinger V, Avendaño LF. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in adult community-acquired pneumonia by PCR and serology. *J Med Microbiol.* 2008;57(12):1491-95.
19. Parrott GL, Kinjo T, Fujita J. A compendium for *Mycoplasma pneumoniae*. *Front Microbiol.* 2016;7:513.
20. Song JH, Huh K, Chung DR. Community-Acquired Pneumonia in the Asia-Pacific Region. *Semin Respir Crit Care Med* 2016;37(6):839–854.
21. Medjo B, Markovic MA, Radic S, Nikolic D, Lukac M, Djukic S. *Mycoplasma pneumoniae* as a causative agent of community-acquired pneumonia in children: clinical features and laboratory diagnosis. *Ital J Pediatr.* 2014;40:104.
22. Loens K, Goossens H, Ieven M. Acute respiratory infection due to *Mycoplasma pneumoniae*: current status of diagnostic methods. *Eur J Clin Microbiol* 2010;29:1055-1069.
23. Atkinson PT, Waites KB. *Mycoplasma pneumoniae* Infections in Childhood. *Pediatr Infect Dis J.* 2014;33(1):92-4.
24. Jacobs E, Ehrhardt I, Dumke R. New insights in the outbreak pattern of *Mycoplasma pneumoniae*. *Int J Med Microbiol.* 2015;305:705-708.
25. Gadsby NJ, Reynolds AJ, McMenamin J. Increased reports of *Mycoplasma pneumonia* from laboratories in Scotland in 2010 and 2011—impact of the epidemic in infants. *EuroSurveill.* 2012;17:20110.
26. Bianchi GP, Kalil J. *Mycoplasma pneumoniae* infection induces asthma onset. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137(4):1024-5.
27. Principi N, Esposito S. Emerging role of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in paediatric respiratory-tract infections. *Lancet Infect Dis.* 2001;1(5):334-44.
28. Atkinson TP. Is asthma an infectious disease? New evidence. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2013;13:702–709.
29. Wang Y, Hao C, Ji W, Yan Y, Shao X, Xu J. Bronchiolitis Associated with *Mycoplasma pneumoniae* in Infants in Suzhou China Between 2010 and 2012. *SCIENTIFIC REPORTS* 2015;5:7846.
30. Biscardi S, Lorrot M, Marc E, Moulin F, Boutonnat- Faucher B, Heilbronner C, *et al.* *Mycoplasma pneumonia* and asthma in children. *Clin Infect Dis.* 2004;38:1341.
31. Paul MA, García C, Vega Briceño L. Infección por *Mycoplasma pneumoniae*. *Rev Neumol Pediatr.* 2007;2(3):140-6.
32. Souza EL, Araújo GN. Infecções Respiratórias por *Mycoplasma pneumoniae* em Crianças. *Pulmão RJ.* 2013;22(3):31-6.
33. Rodrigo Gonzalo de Liria C, Méndez Hernández M. Infecciones causadas por *Mycoplasma pneumoniae*. *An Pediatr Contin.* 2013;11(1):23-9.
34. Cobos N, Pérez Yarza EG. *Tratado de Neumología Infantil.* 2 da ed. Madrid: Ergon; 2009. p. 461-659.
35. Loconsole D, De Robertis A, Mallamaci R, Sallustio A, Morea A, Prato R, *et al.* First Description of Macrolide-Resistant *Mycoplasma pneumoniae* in Adults with Community Acquired Pneumonia in Italy. *BioMed Res Int* 2019;1:1-5.
36. Uh Y, Hong JH, Oh KJ, Cho HM, Park SD, Kim J, *et al.* Macrolide Resistance of *Mycoplasma pneumoniae* and Its Detection Rate by Real-Time PCR in Primary and Tertiary Care Hospitals. *Ann Lab Med* 2013;33:410-414.
37. Copete AR, Aguilar YA, Rueda ZV, Vélez LA. Genotyping and macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* in children with community-acquired pneumonia in Medellín, Colombia. *Int J Infect Dis* 2018;66:113-20.
38. Kogoj R, Praprotnik M, Mrvič T, Korva M, Keše D. Genetic diversity and macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* isolates from two consecutive epidemics in Slovenia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2018;37:99-107.
39. Uldum SA, Bangsborg JM, Gahrn-Hansen B, Ljung R, Molvadgaard M, Fons PR, *et al.* Epidemic of *Mycoplasma pneumoniae* infection in Denmark, 2010 and 2011. *Euro Surveill* 2012;17(5):20073.
40. Dumke R, Luck C, Jacobs E. Low rate of macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* strains in Germany between 2009 and 2012. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:3460.
41. Gullsby R, Olsen B, Bondeson K. Molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* strains in Sweden, 1996–2017, and the emergence of a new P1 cytoadhesin gene, Variant 2e. *J Clin Microbiol* 2019;57(6):e00049-19.
42. Sun H, Xue G, Yan C, Li S, Zhao H, Feng Y, *et al.* Changes in molecular characteristics of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical specimens from children in Beijing between 2003 and 2015. *PLoS One* 2017;12(1):e0170253.
43. Qu J, Chen S, Bao F, Gu L, Cao B. Molecular characterization and analysis of *Mycoplasma pneumoniae* among patients of all age with community-acquired pneumonia during an epidemic in China. *Int J Infect Dis* 2019;83:26-31.
44. Lee E, Cho HJ, Hong SJ, Lee J, Sung H, Yu J. Prevalence and clinical manifestations of macrolide resistant *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in Korean children. *Korean J Pediatr* 2017;60(5):151-157.
45. Tanaka T, Oishi T, Miyata I, Wakabayashi S, Kono M, Sahoko O. Macrolide Resistant *Mycoplasma pneumoniae* Infection, Japan, 2008–2015. *Emerg Infect Dis* 2017;23(10).
46. Zhao F, Liu J, Shi H, Huang F, Liu L, Zhao S, *et al.* Antimicrobial susceptibility and genotyping of *Mycoplasma pneumoniae* isolates in Beijing, China, from 2014 to 2016. *Antimicrob Resist Infect Control* 2019;8:18.
47. Eshaghi A, Memari N, Tang P, Olsha R, Farrell DJ, Low DE, *et al.* Macrolide resistant *Mycoplasma pneumoniae* in humans, Ontario, Canada, 2010–2011. *Emerg Infect Dis* 2013;19(9).

48. Diaz MH, Benitez AJ, Cross KE, Hicks LA, Kutty P, Bramley AM, et al. Molecular Detection and Characterization of *Mycoplasma pneumoniae* Among Patients Hospitalized With Community-Acquired Pneumonia in the United States. *Open Forum Infect Dis* 2015;2:106.
49. Martínez MA, Ruiz M, Zunino E, Luchsinger V, Aguirre R, Aven-
daño LF. Identification of P1 types and variants of *Mycoplasma pneumoniae* during an epidemic in Chile. *J Med Microbiol* 2010;59(8):925-9.
50. Sun H, Xue G, Yan C, Li S, Cao L, Yuan Y, et al. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis of *Mycoplasma pneumoniae* clinical specimens and proposal for amendment of MLVA nomenclature. *PLoS One* 2013;8:e64607.
51. Yan C, Sun H, Lee S, Selvarangan R, Qin X, Tang YW, et al. Comparison of molecular characteristics of *Mycoplasma pneumoniae* collected from U.S. and China. *J Clin Microbiol* 2015;53(12):3891–3893.
52. Kenri T, Okazaki N, Yamazaki T, Narita M, Izumikawa K, Matsuo-
ka M, et al. Genotyping analysis of *Mycoplasma pneumoniae* clinical strains in Japan between 1995 and 2005: type shift phenomenon of *M. pneumoniae* clinical strains. *J Med Microbiol* 2008;57:469475.
53. Benitez AJ, Diaz MH, Wol BJ, Pimentel G, Njenga MK, Estevez A, et al. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis of *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates from 1962 to the present: a retrospective study. *J Clin Microbiol* 2012;50:3620-3626.
54. Waller JL, Diaz MH, Petrone BL, Benítez AJ, Wol BJ, Edison L, et al. Detection and characterization of *Mycoplasma pneumoniae* during an outbreak of respiratory illness at a university. *J Clin Microbiol* 2014;52:849-853.
55. Ho PL, Law PY, Chan BW, Wong CW, To KK, Chiu SS, et al. Emergence of Macrolide Resistant *Mycoplasma pneumoniae* in Hong Kong Is Linked to Increasing Macrolide Resistance in Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis Type 4-5-7-2. *J Clin Microbiol* 201;53:3560-4.
56. Lu ChY, Yen TY, Chang LY, Liao YJ, Liu HH, Huang LM. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) of macrolide-susceptible and resistant *Mycoplasma pneumoniae* in children in Taiwan. *J Formos Med Assoc* 2020;119(10):1539-1545.
57. Lee JK, Seong MW, Shin D, Kim JI, Han MS, Yeon Y, et al. Comparative genomics of *Mycoplasma pneumoniae* isolated from children with pneumonia: South Korea, 2010–2016. *BMC Genomics* 2019;20:910.
58. Ando M, Morozumi M, Adachi Y, Ubukata K, Iwata S. Multilocus sequence typing of *Mycoplasma pneumoniae*, Japan, 2002–2016. *Emerg Infect Dis* 2018;24:1895–1901.
59. Perry JT, Chen WS. Acute *Mycoplasma pneumoniae* infection presenting with unilateral anterior uveitis and perineuritis. *J AAPOS* 2016;20(2):178–180.
60. Salzman MB, Sood SK, Slavin ML. Ocular manifestations of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Clin Infect Dis* 1992;14(5):1137–1139.

Agradecimientos

Los autores del presente trabajo agradecen al Dr. Roger Dumke del Laboratorio de Micoplasmas del Instituto de Microbiología Médica e Higiene de Dresden, Alemania, por sus donaciones de reactivos y revisión crítica del manuscrito.

Conflicto de intereses

Los autores no declaran conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: Nadia M. Rodríguez Preval, Brian Mondeja Rodríguez

Curación de datos: Nadia M. Rodríguez Preval, Brian Mondeja Rodríguez, Ruxana Sardiñas Morales

Análisis formal: Nadia M. Rodríguez Preval, Brian Mondeja Rodríguez, Carlos Pablo Dotres Martínez, Ruxana Sardiñas Morales, Dania Vega Mendoza, Carmen Fernández Molina

Adquisición de fondos: Nadia M. Rodríguez Preval, Brian Mondeja Rodríguez

Investigación: Nadia M. Rodríguez Preval, Brian Mondeja Rodríguez, Carlos Pablo Dotres Martínez, Sardiñas Morales, Dania Vega Mendoza, Carmen Fernández Molina, Odalys Valdés

Metodología: Nadia M. Rodríguez Preval, Brian Mondeja Rodríguez, Ruxana Sardiñas Morales

Administración del proyecto: Nadia M. Rodríguez Preval, Brian Mondeja Rodríguez

Recursos: Nadia M. Rodríguez Preval, Brian Mondeja Rodríguez, Odalys Valdés

Supervisión: Nadia M. Rodríguez Preval, Brian Mondeja Rodríguez, Ruxana Sardiñas

Validación: Nadia M. Rodríguez Preval, Brian Mondeja Rodríguez

Visualización: Nadia M. Rodríguez Preval, Brian Mondeja Rodríguez, Carlos Pablo Dotres Martínez, Ruxana Sardiñas Morales, Dania Vega Mendoza, Carmen Fernández Molina, Odalys Valdés, Lilia M. Ortega, Odalys Marrero

Redacción-borrador original: Nadia M. Rodríguez Preval, Brian Mondeja Rodríguez, Carlos Pablo Dotres Martínez

Redacción-revisión y edición: Nadia M. Rodríguez Preval, Brian Mondeja Rodríguez, Carlos Pablo Dotres Martínez, Carmen Fernandez, Odalys Valdés, Lilia M. Ortega, Odalys Marrero

Financiación

El Ministerio de Salud Pública de Cuba contribuyó al financiamiento de la presente investigación. Igualmente, el Laboratorio de Micoplasmas del Instituto de Microbiología Médica e Higiene de Dresden, Alemania, con la donación de reactivos.

Cómo citar este artículo

Rodríguez Preval NM, Mondeja Rodríguez BA, Dotres Martínez CP, Morales RS, et al. Evidencias de infecciones por *Mycoplasma pneumoniae* en Cuba. *AnAcadCiencCuba* [internet] 2022 [citado en día, mes y año];12(3):e1160. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/1160>

Recibido: 15/10/2021
Aprobado: 24/12/2021

