



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
SECRETARÍA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

**“DETECCIÓN DE *Mycoplasma pneumoniae* EN CUADROS
EXTRAPULMONARES EN PACIENTES PEDIÁTRICOS”**

TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
SUBESPECIALISTA EN INFECTOLOGÍA

PRESENTA:
DRA. KARLA XIMENA LEÓN LARA

TUTOR:
DR. AGUSTÍN DE COLSA RANERO

CO-TUTOR:
DRA. JOCELIN MERIDA VIEYRA

TUTOR METODOLÓGICO:
MRN. CHIHARU MURATA



CIUDAD DE MÉXICO

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

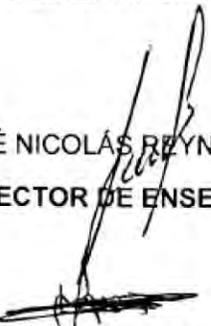
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

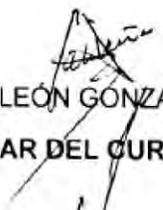
TÍTULO DE TESIS:

**"DETECCIÓN DE *Mycoplasma pneumoniae* EN CUADROS
EXTRAPULMONARES EN PACIENTES PEDIÁTRICOS"**



**DR. JOSÉ NICOLÁS REYNÉS MANZUR
DIRECTOR DE ENSEÑANZA**

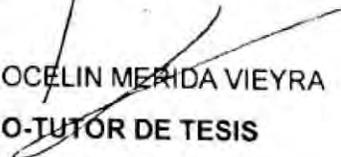
**DR. MANUEL ENRIQUE FLORES LANDERO
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO**



**DR. NAPOLEÓN GONZALEZ SALDAÑA
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE INFECTOLOGÍA**



**DR. AGUSTÍN DE COLSA RANERO
TUTOR DE TESIS**



**DRA. JOCELIN MERIDA VIEYRA
CO-TUTOR DE TESIS**



**MRN. CHIHARU MURATA
TUTOR METODOLÓGICO**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi tutor, Dr. Agustín de Colsa por apoyarme para la realización de este trabajo y darme la oportunidad de formar parte de este proyecto. Además, por todo lo que me ha enseñado durante la residencia de infectología, entre otras cosas a romper paradigmas.

A la Dra. Alejandra Aquino y la Dra. Jocelyn Mérida, por el apoyo e inspiración para continuar el camino de la investigación. Al maestro Chiharu por su entusiasmo para la realización de la tesis.

A mis maestros de infectología por lo que me han enseñado durante la residencia y los retos de aprendizaje que me motivan día a día.

Agradezco a mi esposo y a toda mi familia por apoyarme incondicionalmente.

A los pacientes y sus familias, sin ellos este trabajo no sería posible.

ÍNDICE

ABREVIATURAS _____	vi
INDICE TABLAS _____	vii
I. RESUMEN ESTRUCTURADO _____	1
II. INTRODUCCIÓN _____	2
a. Epidemiología de <i>M. pneumoniae</i> _____	2
b. Patogénesis de <i>M. pneumoniae</i> en manifestaciones extrapulmonares _____	3
c. Inmunidad contra <i>M. pneumoniae</i> _____	4
d. Manifestaciones clínicas extrapulmonares de <i>M. pneumoniae</i> _____	4
e. Diagnóstico de <i>M. pneumoniae</i> _____	7
f. Tratamiento de <i>M. pneumoniae</i> en manifestaciones extrapulmonares _____	8
III. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN _____	9
IV. JUSTIFICACIÓN _____	9
V. OBJETIVOS _____	9
a. Objetivo general _____	9
b. Objetivos particulares _____	10
VI. HIPÓTESIS _____	10
VII. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN _____	10
VIII. DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO _____	11
a. Población objetivo _____	11
b. Población accesible _____	11
c. Criterios de inclusión _____	11
d. Criterios de exclusión _____	11
e. Criterios de eliminación _____	12

f. Ubicación del estudio _____	12
g. Muestreo y tamaño de muestra _____	12
h. Variables del estudio _____	12
IX. MATERIAL Y MÉTODOS _____	12
a. Toma de muestras clínicas _____	13
b. Detección molecular de <i>M. pneumoniae</i> _____	14
c. Diagnóstico serológico de <i>M. pneumoniae</i> _____	14
X. ANÁLISIS ESTADÍSTICO _____	15
XI. CONSIDERACIONES ÉTICAS _____	15
XII. RESULTADOS _____	16
XIII. DISCUSIÓN _____	18
XIV. CONCLUSIONES _____	20
XV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	21
XVI. ANEXOS _____	25

ABREVIATURAS

DE. Desviación estándar.

EEG. Electroencefalograma.

INP. Instituto Nacional de Pediatría.

LCR. Líquido cefalorraquídeo.

ND. No detectado.

NET. Necrosis epidérmica tóxica.

NF. Nasofaríngeo.

PHS. Púrpura de Henoch-Schönlein.

PTI. Púrpura trombocitopenica inmune.

rt-PCR. Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real.

RM. Resonancia magnética

SCN. Sistema nervioso central.

SGB. Síndrome de Guillain-Barré.

SSJ. Síndrome de Stevens–Johnson.

SMF. Síndrome de Miller-Fisher.

UCI. Unidad de cuidados intensivos.

UE. Unidades Estándar.

VEB. Virus Epstein-Barr

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Iniciadores y sondas utilizados para la detección de *M. pneumoniae* a través de PCR en tiempo real _____ **14**

TABLA 2. Resultados de PCR en tiempo real para *M. pneumoniae* _____ **17**

I. RESUMEN ESTRUCTURADO

Introducción: *Mycoplasma pneumoniae* se ha descrito como un patógeno respiratorio, responsable del 4-8% de las neumonías bacterianas comunitarias. En el 25% de los pacientes se relaciona con manifestaciones extrapulmonares principalmente neurológicas, hematológicas y cutáneas. Se ha identificado en el 13% de los casos de encefalitis, 15% de los casos de síndrome de Guillain-Barré y el 13% de los pacientes con enfermedad de Kawasaki. Las manifestaciones extrapulmonares pueden ser de mayor gravedad e impacto clínico que la infección respiratoria.

Material y métodos: Estudio prospectivo, observacional, descriptivo y transversal. Se incluyeron pacientes de 0 a 18 años con alguna manifestación extrapulmonar hospitalizados en el Instituto Nacional de Pediatría. La detección de *M. pneumoniae* se realizó a través de una PCR en tiempo real (rt-PCR) de los genes *p1* y *CARDS* de hisopado nasofaríngeo y material biológico estéril.

Resultados preliminares: Durante el periodo de mayo 2018 a julio 2018 se incluyeron 13 pacientes, siete (54%) con afección neurológica, cuatro (31%) inmunológica y dos (15%) hematológica. No se confirmó ningún caso de manifestación extrapulmonar relacionada con *M. pneumoniae* por medio de rt-PCR de hisopado nasofaríngeo o de muestra biológica estéril.

Conclusiones: La amplificación del gen de la *masaP* por rt-PCR es útil para verificar la calidad de la muestra en diferentes líquidos estériles, así como la ejecución del método. La rt-PCR negativa en muestras biológicas estériles descarta un mecanismo de lesión directa por *M. pneumoniae*. Sin embargo, para evaluar la asociación de manifestaciones extrapulmonares con *M. pneumoniae* es necesaria la detección de anticuerpos.

II. INTRODUCCIÓN

Mycoplasma pneumoniae es una bacteria que pertenece a la clase *Mollicutes*, que incluye bacterias patógenas y comensales humanos, animales vertebrados, artrópodos y plantas. Es el microorganismo más pequeño que infecta al humano con un tamaño de 1-2 um de largo y 0.1-0.2 um de ancho.¹ Esta bacteria se distingue por carecer de pared celular, lo que la hace resistente a los antibióticos betalactámicos y por tener requerimientos especiales para su cultivo y transporte.^{1,2}

a. Epidemiología de *M. pneumoniae*

M. pneumoniae se distribuye por todo el mundo, infecta exclusivamente a humanos y se transmite de persona a persona por las gotas respiratorias infectadas durante el contacto cercano. La infección ocurre con mayor frecuencia durante el otoño y el invierno, pero se puede desarrollar durante todo el año, con ciclos epidémicos cada 3-7 años.³ La mayoría de los brotes se presentan en comunidades cerradas, como bases militares, escuelas, campamentos de verano, comunidades religiosas y hospitales.^{4, 5} Puede infectar a personas de cualquier edad, aunque los casos de infección respiratoria por *M. pneumoniae* incrementan con la edad, con una incidencia del 26% en menores de 5 años y del 60% en mayores de 5 años.⁶

Se ha descrito a *M. pneumoniae* como un patógeno respiratorio de niños y adultos, tanto de la vía aérea superior como inferior. La manifestación respiratoria más frecuente es la traqueoendobronquitis y la de mayor impacto clínico y epidemiológico es la neumonía.^{3,7} Es responsable de aproximadamente del 4 al 8% de las neumonías bacterianas adquiridas en la comunidad durante períodos de endemicidad, en caso de epidemias se incrementa del 20 al 40% y hasta un 70% en poblaciones cerradas.^{4, 5} En EE. UU., se producen más de 2 millones de infecciones anuales por *M. pneumoniae* y al menos un caso de neumonía por cada 1,000 personas al año.⁸

La detección de *M. pneumoniae* en muestras clínicas ha mejorado gracias a la disponibilidad de métodos moleculares, por lo que se ha relacionado a numerosos cuadros en cualquier órgano y sistema, principalmente el sistema nervioso central (SNC), hematológico y cutáneo. Aunque las enfermedades respiratorias son la presentación más frecuente de las infecciones por *M. pneumoniae*, las manifestaciones extrapulmonares

pueden ser de mayor gravedad e impacto clínico.^{7,9} Los cuadros extrapulmonares pueden estar presentes hasta en el 25% de los pacientes con infección por *M. pneumoniae*, los cuales pueden ir o no acompañados de síntomas respiratorios.¹⁰ Las complicaciones neurológicas son las más frecuentes, ocurren del 1 al 7% de los pacientes con serología positiva para *M. pneumoniae*, presentando secuelas a largo plazo hasta en el 65% de los casos.^{11, 12, 13}

b. Patogénesis de *M. pneumoniae* en manifestaciones extrapulmonares

Se han propuesto tres mecanismos por los cuales *M. pneumoniae* puede causar enfermedad extrapulmonar:^{2, 14}

1. Invasión directa de la bacteria al sitio anatómico específico, lo que ocasiona un daño y respuesta inflamatoria local. Esta es la forma más frecuente en la que se produce enfermedad pulmonar, aunque también se ha relacionado a cuadros de encefalitis, artritis y endocarditis, ya que se ha encontrado a *M. pneumoniae* mediante detección de ácidos nucleicos o cultivo en líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido sinovial, líquido pericárdico y lesiones cutáneas. Este mecanismo de lesión se produce a partir de un organelo de adherencia formado principalmente por proteínas como: la adhesina P1, la P30 y accesorias como las proteínas de alto peso molecular (HMW-1, HMW-2 y HMW-3), proteína A, proteína B, proteína C, P65 y P116. A través de estas proteínas se favorece la adhesión a las membranas epiteliales con particular afinidad por el epitelio ciliar respiratorio. Una vez unido, *M. pneumoniae* produce peróxido de hidrógeno y superóxido, que lesionan a las células epiteliales y sus cilios asociados.^{9, 14, 15}
2. Lesión indirecta en la que se desencadena una respuesta inmunológica contra la bacteria, generando complejos inmunes o autoinmunidad. Aunque es difícil comprobar el papel patogénico de *M. pneumoniae* en este mecanismo de patogenicidad.^{14, 15}
3. Oclusión vascular que ocasiona isquemia, derivada de una lesión directa o indirecta por la bacteria.^{2, 14, 16}

c. Inmunidad contra *M. pneumoniae*

M. pneumoniae induce una respuesta inmunitaria tanto celular como humoral, la cual depende del estado inmunológico del huésped e impacta directamente en la gravedad del cuadro y la aparición de complicaciones extrapulmonares.³ La respuesta celular involucra la activación de macrófagos, mastocitos, neutrófilos y células NK, posteriormente la activación de linfocitos T y B. La respuesta humoral consiste en la producción de anticuerpos IgM, IgG e IgA, los cuales no protegen contra infecciones posteriores, pero si modulan la infección aguda. Los pacientes con deficiencia de anticuerpos, pueden cursar con cuadros clínicos más graves y prolongados, con mayor riesgo de complicaciones extrapulmonares, como encefalitis y artritis.^{3, 17} Los antígenos de *M. pneumoniae* que determinan la respuesta humoral incluyen glucolípidos y proteínas. La proteína P1 es la principal adhesina de la bacteria y la proteína más antigénica, por lo que desencadena una mayor y temprana respuesta de anticuerpos, los cuales se encuentran más regularmente en el suero de pacientes infectados.¹⁷ Otras proteínas inmunogénicas localizadas en la superficie de la bacteria participan en la respuesta inmune cruzada contra los componentes de la matriz extracelular del huésped, creando una respuesta de autoinmunidad.^{8,17}

d. Manifestaciones clínicas extrapulmonares de *M. pneumoniae*

M. pneumoniae participa en numerosos cuadros extrapulmonares, principalmente neurológicos, hematológicos y cutáneos.⁵ Las complicaciones extrapulmonares se observan hasta en el 25% de las personas infectadas con *M. pneumoniae*, los cuales se presentan antes, durante o después de las manifestaciones pulmonares o incluso ocurren en ausencia de síntomas respiratorios.^{9, 10} En algunos casos están involucrados múltiples órganos al mismo tiempo, lo que lleva a una presentación más grave.³

Las manifestaciones neurológicas se presentan del 1 al 7% de los pacientes hospitalizados con infección pulmonar por *M. pneumoniae*, de los cuales 30% requerirán ingresar a unidad de cuidados intensivos (UCI) y del 35 al 65% tendrán secuelas a largo plazo.^{12, 13, 18} Son más frecuentes en menores de 10 años que en adultos, en niños el 11.5% de las complicaciones neurológicas son atribuidas a *M. pneumoniae*.¹⁹ Las manifestaciones del SNC más frecuentes son la encefalitis en el 52% y la meningoencefalitis, seguidas de la poliradiculitis y la meningitis aséptica.¹²

M. pneumoniae es responsable del 13% de los casos de encefalitis.³ La patogénesis de la encefalitis aún no está bien definida, se postula que la encefalitis de inicio temprano es provocada por un efecto directo de la bacteria, ya que en este tipo de encefalitis la PCR para *M. pneumoniae* es frecuentemente positiva; mientras que en la encefalitis tardía se asocia a una respuesta inmunológica contra componentes antigénicos de la bacteria, ya que se presenta con PCR negativa para *M. pneumoniae* y con anticuerpos anti-tejido cerebral positivos.^{14, 16, 20}

Las manifestaciones del SNC más graves son la mielitis transversa y la encefalopatía diseminada aguda, que representan el 12% de las complicaciones neurológicas causadas por *M. pneumoniae* en niños.^{19, 20, 21} Entre el 5 y 15% de los casos del síndrome de Guillain-Barré (SGB) se asocia a la infección por *M. pneumoniae*, en el desarrollo de este síndrome se propone un efecto de autoinmunidad ya que los pacientes con anticuerpos IgM contra *M. pneumoniae* positivos tienen anticuerpos anti-mielina, por ejemplo antigalactocerebrósidos positivos.⁸ Otras manifestaciones neurológicas que se relacionan con *M. pneumoniae* son la meningitis aséptica, la ataxia cerebral aguda, el síndrome de Miller-Fisher (SMF) y las neuropatías craneales o periféricas. El 80% de los cuadros del SNC están precedidos de síntomas respiratorios que se presentan de una a dos semanas antes, por lo que *M. pneumoniae* se debe considerar dentro del diagnóstico diferencial de pacientes con síntomas del SNC especialmente si se asocia a neumonía.¹⁹

La infección por *M. pneumoniae* se relaciona en un 25% con manifestaciones cutáneas,⁹ las cuales se pueden presentar como un exantema transitorio o como síndrome de Stevens–Johnson (SSJ) en el 1 al 5%, eritema multiforme y necrosis epidérmica tóxica (NET).^{22,29} Es el agente infeccioso más frecuentemente asociado con el SSJ, presente hasta en el 22% de los casos.²³ Cuando este síndrome es causado por *M. pneumoniae* se presenta una mayor afección de mucosas, menor afección a piel, en brotes epidémicos, una evolución menos grave y mejor respuesta a esteroides comparado con el asociado a medicamentos.^{14, 23, 24} Se ha propuesto un efecto sinérgico de la bacteria con algunos medicamentos para el desarrollo de lesiones en piel y mucosas.²⁵ A pesar de que se ha encontrado a la bacteria en lesiones cutáneas, aún no está claro si *M. pneumoniae* causa las lesiones directamente o son debidas a un efecto inflamatorio causado por la presencia de la bacteria en la piel.²¹

Dentro de las manifestaciones hematológicas desencadenadas por *M. pneumoniae* están la anemia hemolítica, el síndrome hemofagocítico, el síndrome hemolítico urémico, la púrpura de Henoch-Schönlein (PHS) y la púrpura trombocitopenica inmune (PTI), en las que se ha observado una presentación más grave comparada con las no asociadas a la bacteria.^{26, 42} La anemia hemolítica autoinmune se relaciona con infección grave por *M. pneumoniae*, la cual se desarrolla por la producción en el 60% de anticuerpos fríos IgM contra el antígeno I del eritrocito.²⁷ *M. pneumoniae* induce la vasculitis leucocitoclástica de la púrpura de Henoch-Schönlein al estimular la producción de interleucinas y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), aunque su relación aún no está confirmada.^{28, 29}

El compromiso cardiovascular se encuentra en el 1 al 8.5% de los pacientes con serología positiva para *M. pneumoniae*, es más frecuente en adultos. Las principales complicaciones cardiacas relacionadas con la bacteria son pericarditis, miocarditis y endocarditis, las cuales pueden cursar asintomáticas o manifestarse con cuadros graves que ponen en riesgo la vida. La afección cardiaca parece estar en relación a una lesión directa de la bacteria, ya que en la mayoría de los casos se detecta al microorganismo por cultivo o PCR en el tejido cardíaco afectado o líquido pericárdico, en el caso de miocarditis también se propone un mecanismo autoinmune.^{9, 14}

M. pneumoniae se detecta en el 13% de los pacientes con enfermedad de Kawasaki, por lo que la infección por esta bacteria se propone como uno de los factores predisponentes para la enfermedad, estos pacientes se caracterizan por tener síntomas respiratorios previos y mayor edad.^{30, 31} La infección respiratoria por *M. pneumoniae* puede estar asociada a una gran variedad de manifestaciones gastrointestinales no específicas como náuseas, vómitos y diarrea. En raras ocasiones se asocia a hepatitis y pancreatitis.^{3, 14, 43} La elevación de enzimas hepáticas es generalmente asintomática.⁴³

Las mialgias, artralgiyas y poliartropatías inespecíficas ocurren del 14% al 45% de los pacientes con infección aguda por *M. pneumoniae* y en ocasiones pueden persistir durante períodos prolongados. La detección de la bacteria en el líquido sinovial ocurre más frecuentemente en pacientes con hipogammaglobulinemia.^{3,9} La artritis también puede ocurrir en pacientes inmunocompetentes con neumonía por *M. pneumoniae*, en las que se propone un mecanismo autoinmune.³

e. Diagnóstico de *M. pneumoniae*

El diagnóstico de la infección por *M. pneumoniae* se puede realizar con cultivo, serología o métodos moleculares. El cultivo es el estándar de oro para el diagnóstico de infección por *M. pneumoniae*, puede detectar de 100-1,000 bacterias viables en condiciones óptimas; sin embargo, requiere un medio adecuado de transporte, de medios enriquecidos para su cultivo y de tres a seis semanas para su crecimiento, lo que lo hace difícil de cultivar.^{3, 32}

La amplificación de ácidos nucleicos por PCR, para la detección directa de la bacteria, tiene mayor sensibilidad en comparación con el cultivo, sensibilidad del 79 al 90% y especificidad del 98%; aunque no puede distinguir adecuadamente la infección activa del estado portador. Los blancos genómicos más utilizados son el gen del operón de ATPasa, el gen de la proteína de superficie P1, regiones conservadas de la subunidad 16S rRNA y el gen *tuf*. Por medio de esta técnica molecular se puede detectar el genoma de *M. pneumoniae* en situaciones donde el microorganismo ya no es viable, como muestras contaminadas o tejidos procesados para examen histopatológico. Las muestras clínicas disponibles para la prueba de PCR incluyen secreciones orofaríngeas, nasofaríngeas, expectoración, lavado traqueobronquial y biopsia de pulmón.^{32, 33} Además de LCR, líquido pericárdico o articular para algunas manifestaciones extrapulmonares como encefalitis, pericarditis o artritis, según sea el caso.¹⁴

La identificación de *M. pneumoniae* por cultivo o por detección de ácidos nucleicos en muestras clínicas del tracto respiratorio superior no siempre es adecuada para diagnosticar las manifestaciones extrapulmonares asociadas a la bacteria, ya que estas se pueden presentar en ausencia de síntomas respiratorios. Para el diagnóstico de los cuadros extrapulmonares relacionados a *M. pneumoniae* se recomienda realizar también serología, para la detección de anticuerpos IgA, IgM e IgG anti-*M. pneumoniae*. Los anticuerpos IgM son detectados de 7 a 10 días de la infección y los IgG se elevan después de 14 días. La producción de anticuerpos IgA ocurre muy temprano en la infección por *M. pneumoniae*, aunque su incremento es poco frecuente en pediatría.¹⁷ Los títulos individuales elevados de anticuerpos IgM al inicio de la enfermedad indican una infección activa y un incremento igual o mayor de 4 veces de los títulos de IgM e IgG entre la fase aguda y de convalecencia confirman la infección.^{8, 14, 33} Los anticuerpos IgM son positivos en el 52% de los pacientes en la fase aguda de la enfermedad y en el 88% en la fase de convalecencia,

por lo que para incrementar la sensibilidad en el diagnóstico es necesario realizar una muestra pareada. La producción de anticuerpos disminuye en pacientes con inmunocompromiso y después de la administración de antibióticos contra *M. pneumoniae*.⁸

El uso de la PCR en combinación con la serología mejora la sensibilidad diagnóstica de las manifestaciones extrapulmonares y ayuda a distinguir entre la colonización y la infección por *M. pneumoniae*.^{14, 34}

f. Tratamiento de *M. pneumoniae* en manifestaciones extrapulmonares

Los macrólidos son los antibióticos de elección para tratar infecciones respiratorias por *M. pneumoniae*. Para el tratamiento de las manifestaciones extrapulmonares el uso de antibióticos es útil cuando el cuadro es originado por una invasión directa de la bacteria al sitio anatómico específico.³ Para las complicaciones extrapulmonares más graves, como encefalitis o SJS, se recomienda el uso de inmunomoduladores, como corticosteroides o inmunoglobulina, ya que estos cuadros son ocasionados por una respuesta inmunológica contra la bacteria, con la formación de autoanticuerpos y complejos inmunes.¹⁴ Además los antibióticos, al disminuir la carga bacteriana en el tracto respiratorio, pueden reducir la estimulación adicional del sistema inmune, en particular los macrólidos a los que se les han atribuido efectos antiinflamatorios.³ Se ha descrito el tratamiento con anticoagulantes para las manifestaciones ocasionadas por oclusión vascular; sin embargo, se requieren más estudios para realizar una estrategia terapéutica integral.^{14, 5}

III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

1. ¿Cuál es la frecuencia de *M. pneumoniae* en cuadros extrapulmonares en pacientes pediátricos?

IV. JUSTIFICACIÓN

La mayoría de los estudios epidemiológicos y clínicos sobre *M. pneumoniae* se enfocan en la relación etiológica de la bacteria con neumonía adquirida en la comunidad; sin embargo, hasta el 25% de las personas infectadas con *M. pneumoniae* presentan una complicación extrapulmonar, principalmente neurológica, hematológica y cutánea. *M. pneumoniae* se ha identificado hasta en el 13% de los casos de encefalitis, 15% de los casos de SGB, 13% de los pacientes con enfermedad de Kawasaki y es el agente infeccioso más frecuentemente asociado con el SSJ. Las manifestaciones extrapulmonares pueden llegar a ser de mayor gravedad e impacto clínico que la infección respiratoria primaria, en el caso de afección a SNC hasta un tercio tendrán secuelas a largo plazo. Cuando están involucrados múltiples órganos al mismo tiempo la presentación es más grave. Hasta el momento no se ha llevado a cabo ningún estudio prospectivo sobre la detección de *Mycoplasma pneumoniae* por PCR y serología en cuadros extrapulmonares en pacientes pediátricos. En el Instituto Nacional de Pediatría (INP) se ha reconocido a *M. pneumoniae* como agente etiológico de neumonía adquirida en la comunidad; sin embargo, la información sobre las manifestaciones extrapulmonares asociadas a la infección por *M. pneumoniae* es escasa por lo que este estudio ofrecerá información epidemiológica sobre esta relación.

V. OBJETIVO

a. Objetivo general: Describir la frecuencia de *M. pneumoniae* en manifestaciones extrapulmonares en pacientes pediátricos.

b. Objetivos particulares

1. Detectar a *M. pneumoniae* en muestras biológicas de pacientes pediátricos con cuadros extrapulmonares
2. Cuantificar IgG e IgM anti-P1 de *M. pneumoniae*.
3. Relacionar la presencia de *M. pneumoniae* en muestras biológicas, con los resultados de las pruebas serológicas y el cuadro clínico del paciente.
4. Describir las características epidemiológicas, clínicas, radiológicas y de laboratorio de los pacientes con manifestaciones extrapulmonares por *M. pneumoniae*.
5. Determinar la presencia de síntomas respiratorios y/o la asociación a neumonía en los cuadros extrapulmonares por *M. pneumoniae*.
6. Describir la evolución clínica y desenlace en los cuadros extrapulmonares por *M. pneumoniae*.

VI. HIPÓTESIS

M. pneumoniae estará asociado en el 10% de los pacientes pediátricos con manifestaciones extrapulmonares.

VII. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Es un estudio observacional, prospectivo, transversal y descriptivo.

VIII. DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

a. Población objetivo. Pacientes de 0 a 18 años hospitalizados en el INP.

b. Población accesible. Pacientes de 0 a 18 años hospitalizados en el INP durante un periodo de 24 meses, que cumplan con los criterios de inclusión.

c. Criterios de inclusión

- Pacientes de 0-18 años de ambos sexos, hospitalizados en el INP, con alguno de los siguientes diagnósticos:
 - o **Neurológico:** Encefalitis, meningitis aséptica, mielitis transversa, encefalopatía diseminada aguda, cerebelitis/ataxia cerebral aguda, SGB, SMF, neuropatías craneales y/o periféricas.
 - o **Hematológico:** Anemia hemolítica autoinmune, síndrome hemofagocítico, síndrome hemolítico urémico, PTI, PHS.
 - o **Dermatológico:** SSJ, NET, eritema multiforme.
 - o **Cardiológico:** Miocarditis, pericarditis.
 - o **Gastrohepático:** Hepatitis, pancreatitis.
 - o **Inmunológico:** Enfermedad de Kawasaki.
- Pacientes previamente sanos o con alguna patología de base.
- Pacientes que cuenten con el consentimiento y/o asentimiento informado por parte del padre o madre o tutor.

d. Criterios de exclusión

- Pacientes a los que por cualquier motivo no se les pueda tomar las muestras biológicas respectivas para el análisis (sangre, hisopado nasofaríngeo y muestra biológica que aplique dependiendo del diagnóstico).
- Pacientes que no cumplan con la definición operacional del diagnóstico que corresponda (**Anexo 1**).

- Pacientes que no acepten el ingreso al protocolo.

e. Criterios de eliminación

- Pacientes cuyo padre/madre o tutor decida retirar al paciente del estudio.

f. Ubicación del estudio

El INP es un hospital pediátrico de tercer nivel de atención. Funciona como centro de referencia para especialidades pediátricas como neurología, hematología, dermatología, cardiología, gastroenterología e inmunología. El hospital tiene 243 camas censables de hospitalización y registró 7,830 egresos en el año 2016. Cuenta con un Laboratorio de Microbiología Molecular, en donde se realizarán las pruebas moleculares y los métodos serológicos específicos.

g. Muestreo y tamaño de muestra

La muestra es a conveniencia, se incluyeron todos los individuos hospitalizados que cumplieron con los criterios de inclusión durante el periodo del estudio.

h. Variables del estudio

En el **anexo 2**, se encuentran las variables a analizar en el estudio.

IX. MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron de mayo del 2018 a julio del 2018 los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión y de los que se obtuvo la carta de consentimiento y en su caso de asentimiento informado. El diagnóstico de cada manifestación extrapulmonar se realizó en conjunto con el servicio de subespecialidad respectivo, incluido neurología, hematología, dermatología, cardiología, gastroenterología e inmunología. De cada paciente se

registraron los datos requeridos en la hoja de recolección (**Anexo 3**). De acuerdo a los resultados del perfil serológico y los de la PCR en tiempo real se clasificó la relación de *M. pneumoniae* con el cuadro clínico de la siguiente manera:

- **Enfermedad confirmada:** PCR positiva para *M. pneumoniae* en muestra biológica estéril según sea el caso (LCR, líquido pericárdico) con o sin evidencia serológica de infección.
- **Enfermedad probable:** PCR positiva para *M. pneumoniae* en muestra respiratoria más evidencia serológica de infección.
- **Enfermedad posible:** PCR para *M. pneumoniae* negativa en muestra biológica estéril y en muestra respiratoria más evidencia serológica de infección.
- **Enfermedad indeterminada:** PCR positiva para *M. pneumoniae* en muestra respiratoria sin evidencia serológica de infección.
- **Evidencia serológica de infección:** títulos elevados de anticuerpos IgM al inicio de la enfermedad o incremento igual o mayor de 4 veces de los títulos de IgG entre la fase aguda y de convalecencia.
- **Coinfección:** detección de otro patógeno por serología, PCR o cultivo, realizados como parte del abordaje diagnóstico de rutina según sea el caso.

a. Toma de las muestras clínicas

De cada paciente se tomó una muestra de 3mL de sangre al ingreso y una segunda muestra después de 2-4 semanas de la primera. La toma de sangre periférica se realizó por venopunción mediante un sistema al vacío en tubos con citrato de sodio como anticoagulante. Esta muestra de sangre se centrifugó para obtener el plasma el cual se conservó en alícuotas de 200µL a -70°C para posteriormente realizar la serología específica para *M. pneumoniae*.

Se tomó una muestra respiratoria con un hisopo de rayón fino, flexible y elástico que permitió la introducción del hisopo a la nasofaringe, para la detección molecular de *M. pneumoniae*. En el caso de que durante la hospitalización se haya obtenido como parte del abordaje diagnóstico de rutina para la enfermedad respectiva LCR, líquido pleural, líquido

pericárdico u otro líquido estéril, se solicitó una alícuota de la muestra en tubo estéril, para la detección molecular de *M. pneumoniae*.

b. Detección molecular de *M. pneumoniae*

- **Extracción de DNA.** El DNA de las muestras se extrajo utilizando el kit QIAampDNA (QIAGEN) siguiendo las instrucciones de fabricante. La elución del DNA se hizo en 200uL de agua libre de nucleasas y fue conservado a -20°C hasta su uso.

-**PCR en tiempo real.** La detección de *M. pneumoniae* se realizó mediante la rt-PCR basada en la detección de dos blancos genéticos: el gen de la adhesina *p1* y la toxina *CARDS*. Se utilizó como control interno el gen humano *masaP*. Se usaron sondas TaqMan y la mezcla de reacción TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Los iniciadores y sondas que se utilizaron se muestran en la **tabla 1**. La PCR en tiempo real se realizó en el sistema de detección ABI-7500 Fast (Applied Biosystems).

Tabla 1. Iniciadores y sondas utilizados para la detección de *M. pneumoniae* a través de PCR en tiempo real.^{35, 36, 37}

Blanco	Secuencia	Tamaño pb
<i>CARDS</i>	F: TTTGGTAGCTGGTTACGGGAAT R: GGTCGGCACGAATTTTCATATAAG 6-FAM-TGTACCAGAGCACCCAGAAGGGCT-TAMRA	73
<i>p1</i>	F: GGTCAACACATCAACCTTTTGGT R: TGTGATTGTGCTCAGTGTTACCT 6-FAM-ACCCAGCCTTCAAGGCCTGTTTGTCTTGT-TAMRA	117
<i>masaP</i>	F: AGATTTGGACCTGCGAGCG R: GAGCGGCTGTCTCCACAAGT 6-FAM-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGG-TAMRA	65

- **Interpretación de la PCR en tiempo real.** Para que un ensayo se considerara válido, el control positivo de los genes *p1* y *CARDS* debieron amplificar, los blancos dar un resultado negativo y la muestra tener un $C_T < 35$ para el gen de *masaP*, un $C_T < 38.8$ para el gen *p1* y un $C_T < 38.7$ para el gen *CARDS*. Posterior a la verificación de estos parámetros se obtuvo el promedio del triplicado de los C_T de cada uno de los genes evaluados.

c. Diagnóstico serológico de *M. pneumoniae*

El diagnóstico serológico se realizará cuando se cuente con el plasma de 30 pacientes. Para la detección de anticuerpos IgM e IgG anti *p1* de *M. pneumoniae* se realizará un inmunoensayo enzimático indirecto en fase sólida con el kit de ELISA Anti-*M. pneumoniae* human (Abcam, Cambridge, Reino Unido), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizará un anticuerpo conjugado anti IgM/IgG. Se medirá la absorbancia a 450 nm en el lector de placas Epoch. La intensidad del color será directamente proporcional a la concentración de anticuerpos contra *M. pneumoniae*. En cada determinación se incluirá un blanco, un control negativo, un control de punto de corte y un control positivo. Los resultados se expresarán en Unidades Estándar (UE) y se interpretará de la siguiente manera: prueba positiva >11 UE, indeterminado 9-11 UE y prueba negativa <9 UE para ambas inmunoglobulinas. El incremento igual o mayor de 4 veces de los títulos de IgM e IgG entre dos muestras realizadas con 2 a 4 semanas de diferencia se interpretarán como seroconversión para *M. pneumoniae*.

X. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó análisis de estadística descriptiva, se reportaron frecuencia absoluta y relativa para variables cualitativas; mediana y rango intercuartil para variables cuantitativas con distribución no normal o media y desviación estándar (DE) para variables con distribución normal. Para el análisis estadístico se utilizó el programa JMP10 de SAS Institute, Inc.

XI. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente protocolo fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética del INP con el número IRB:00008064, registrado con el número 020/2018.

XII. RESULTADOS PRELIMINARES

Se incluyeron 13 pacientes 8 (62%) del género femenino y 5 (38%) del masculino. La mediana de edad al momento del diagnóstico fue de 3 años 6 meses, con un mínimo de 4 meses y un máximo de 17 años.

Todos los pacientes se consideraban previamente sanos antes del inicio de los síntomas. Cinco (38%) pacientes presentaron síntomas respiratorios prodrómicos, con un promedio de 8 días de duración, caracterizado por fiebre en el 80%, tos y rinorrea en el 100%, odinofagia en el 40% y datos de dificultad respiratoria en el 20%. Solo un paciente presentó estertores subcrepitantes a la exploración física e infiltrado intersticial bilateral en la radiografía de tórax.

De los 13 pacientes estudiados siete (54%) presentaron afección neurológica, cuatro (31%) inmunológica y dos (15%) hematológica. De los siete pacientes con manifestación neurológica se incluyeron cuatro pacientes con encefalitis aguda, un paciente con SGB, un paciente con SMF y un paciente con cerebelitis aguda. Las manifestaciones neurológicas más frecuentes al ingreso fueron crisis convulsivas y alteración del estado de alerta en el 57%, debilidad, diplopía, alucinaciones y cambios en la personalidad 42%. Se observó pleocitosis en LCR en cuatro pacientes (57%) a expensas de mononucleares y proteinorraquia en tres (42%) pacientes. No se confirmó ningún agente etiológico infeccioso por tinción de Gram, cultivo o PCR múltiple (FilmArray® Meningitis/encefalitis) de LCR.

Tres pacientes con afección inmunológica presentaron enfermedad de Kawasaki, los criterios de diagnóstico incluyeron fiebre y cambios en la mucosa en todos los pacientes. Dos (66%) presentaron carga viral positiva para virus Epstein-Barr (VEB) de 1,799 y 7, 002 copias/mL. El cuarto paciente con afección inmunológica fue una paciente con artritis de cadera probablemente reactiva, en la que no se confirmó agente etiológico por tinción de Gram, cultivo de líquido sinovial, ni estudio histopatológico de muestra articular.

Los diagnósticos de los pacientes con manifestaciones hematológicas fueron un paciente con PTI y un paciente con síndrome hemolítico urémico.

Todos los pacientes incluidos requirieron hospitalización por la manifestación extrapulmonar, con una mediana de hospitalización de 20 días, con un mínimo de 10 y un máximo de 76 días. Tres (27%) requirieron ingreso a la terapia intensiva con una mediana de hospitalización de 33 días, con un mínimo de 5 días y un máximo de 73 días. Ninguna manifestación extrapulmonar fue causa de muerte.

No se confirmó ningún caso de manifestación extrapulmonar relacionada con *M. pneumoniae* por medio de PCR de hisopado nasofaríngeo o de muestra biológica estéril. En la tabla 2, se muestran los C_T de la PCR de los genes *rnasaP*, *p1* y *CARDS*.

Tabla 2. Resultados de PCR en tiempo real para *M. pneumoniae*.

Caso	C_T <i>rnasaP</i>	C_T gen <i>p1</i>	C_T gen <i>CARDS</i>
1	NF 26.076	ND	ND
2	NF 24.582 / LCR 35.597	ND	ND
3	LBA 26.398 / LCR 35.416	ND	ND
4	NF 28.813 / LCR 32.590	ND	ND
5	NF 28.754	ND	ND
6	NF 29.537 / LCR 36.102	ND	ND
7	NF 29.221	ND	ND
8	NF 34.407	ND	ND
9	NF 25.792 / LCR 34.757	ND	ND
10	NF 34.6	ND	ND
11	NF 24.175 / LCR 35.170	ND	ND
12	NF 26.509/ Biopsia 26.306	ND	ND
13	NF 29.641 /LCR 34.114	ND	ND

XIII. DISCUSIÓN

Las técnicas moleculares para la detección de *M. pneumoniae* actualmente se consideran la prueba de referencia para el diagnóstico directo de *M. pneumoniae* en infecciones respiratorias. Han reemplazado al cultivo que, aunque es 100% específico, es un procedimiento lento, requiere de laboratorios con experiencia para lograr el mejor rendimiento de sensibilidad y requieren la presencia de organismos viables.^{3, 33} Dentro de las técnicas moleculares en desarrollo, la rt-PCR es la más utilizada para el diagnóstico de rutina.³⁷ El control de calidad interno es una parte esencial que garantiza la calidad de la prueba.³³ En nuestro caso, la amplificación del gen de la *mpnaP* por rt-PCR como control interno, resultó positivo en todas las muestras biológicas tanto respiratorias como en los diferentes líquidos estériles examinados, por lo que este gen se recomienda para evaluar la calidad de la muestra biológica, la extracción de DNA y la ejecución del método de rt-PCR.

El diagnóstico de *M. pneumoniae* por técnicas moleculares ha mostrado ser de utilidad en cuadros clínicos extrapulmonares.³² La detección de *M. pneumoniae* por rt-PCR en material biológico estéril provee evidencia concluyente de infección por *M. pneumoniae* en el sitio afectado.^{2, 32} En el caso de las manifestaciones neurológicas la identificación por PCR de *M. pneumoniae* en LCR es variable. Bitnun y col.¹³ detectaron a *M. pneumoniae* mediante PCR en LCR en seis casos (3.7%) de 159 pacientes con encefalitis. Daxboeck y col.³⁸ presentaron una revisión de 58 pacientes con encefalitis por *M. pneumoniae* de los cuales ocho casos (14%) se diagnosticaron por PCR positiva en LCR. En nuestro estudio, no confirmamos ningún caso relacionado con *M. pneumoniae* por medio de rt-PCR en muestras biológicas estériles, con lo que descartamos que estos cuadros sean producidos por un mecanismo de lesión directa por *M. pneumoniae*.

El valor predictivo negativo de la detección molecular de *M. pneumoniae* es baja en algunas manifestaciones extrapulmonares que pueden ser potencialmente inmunomediadas o causadas por fenómenos trombóticos y por lo tanto no están asociadas con una invasión directa de la bacteria.^{14, 32} Como es el caso de las manifestaciones hematológicas e inmunológicas, en donde la infección por *M. pneumoniae* desencadena la producción de anticuerpos con reacción cruzada a plaquetas, producción de citocinas

inflamatorias que inducen disfunción endotelial y menor síntesis de factores de anticoagulación.^{2,14} En la enfermedad de Kawasaki, se ha descrito que algunas proteínas de membrana asociadas a lípidos, como la proteína N602 de *M. pneumoniae* actúan como superantígenos activando a las células T y desencadenando una respuesta inflamatoria exagerada que genera una vasculitis sistémica.^{2, 31} Por lo que la falta de detección de *M. pneumoniae* por rt-PCR no descarta a este microorganismo como causa de enfermedad extrapulmonar en los pacientes incluidos, en los que la enfermedad puede ser causada por un mecanismo de lesión indirecta. En estos casos el diagnóstico se puede hacer mediante serología, aunque aún no se sabe con certeza si los resultados positivos están relacionados con la enfermedad extrapulmonar. Hay una mayor asociación si se descartan otras posibles causas.

La principal causa de resultados falsos negativos de la PCR y serología es el tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas hasta la toma de la muestra.³ La detección de DNA de *M. pneumoniae* en muestras biológicas estériles es más probable en caso de enfermedad de inicio temprano (definida como inicio de enfermedad 7 días después del inicio de la fiebre) que para pacientes con enfermedad de inicio tardío (definida como inicio de enfermedad >8 días después del inicio de la fiebre).^{38, 39,40} En cinco pacientes incluidos en nuestro estudio, la muestra biológica estéril se obtuvo después del séptimo día, lo que disminuye la probabilidad de encontrar DNA de la bacteria. Por lo que para mejorar la sensibilidad en infecciones agudas por *M. pneumoniae*, la toma de la muestra se debe realizar preferentemente dentro de la primera semana después del inicio de los síntomas.

Hasta el momento, ninguna prueba individual ha sido considerada como la herramienta óptima de diagnóstico para *M. pneumoniae*. Las enfermedades extrapulmonares se pueden diagnosticar solo mediante detección directa de *M. pneumoniae* con rt-PCR, pero el diagnóstico está limitado por la probabilidad de que la enfermedad este mediada inmunológicamente. Por lo que para el diagnóstico de manifestaciones extrapulmonares por *M. pneumoniae*, la serología y la PCR deben combinarse. La falta de una prueba diagnóstica inmunológica limita el conocer la frecuencia de *M. pneumoniae* en manifestaciones extrapulmonares. Se requiere de un método de diagnóstico rápido, preciso, de bajo costo y que se pueda realizar por cada paciente para el diagnóstico etiológico de la infección por *M. pneumoniae*.

Pese a los inconvenientes para la detección de *M. pneumoniae*, la inclusión de estos pacientes será importante porque definirá si en el INP se debe considerar a este patógeno como agente causal de manifestaciones extrapulmonares. Aunque la diseminación fuera del tracto respiratorio ocurre y la bacteria pueda ocasionar lesión directa, es probable que los mecanismos autoinmunes sean tengan un papel importante en la fisiopatología de algunas manifestaciones extrapulmonares.

XIV. CONCLUSIONES

1. La amplificación del gen de la *mpnaP* por rt-PCR, como control interno, es útil para verificar la calidad de la muestra biológica en diferentes líquidos estériles, así como de la ejecución del método.
2. En ningún caso se detectó a *M. pneumoniae* por rt-PCR.
3. La rt-PCR negativa para a *M. pneumoniae* en las muestras de LCR y biopsia sinovial descarta el mecanismo de lesión directa.
4. A pesar de contar con PCR para el diagnóstico de manifestaciones extrapulmonares sigue siendo indispensable la serología.

XV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Waites KB, Taylor-Robinson D. *Mycoplasma* and *Ureaplasma*. En: Jorgensen J, Pfaller M, Carroll K, Funke G, Landry M, Richter S, Warnock D (ed). Manual of Clinical Microbiology. 11va edición. ASM Press, Washington, DC.: 2015. p.1088-1105.
2. Poddighe D. Extra-pulmonary diseases related to *Mycoplasma pneumoniae* in children: recent insights into the pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol*. 2018; 30(4):380-387.
3. Waites KB, Xiao L, Liu Y, Balish MF, Atkinson TP. *Mycoplasma pneumoniae* from the respiratory tract and beyond. *ClinMicrobiol Rev*. 2017; 30(3):747-809.
4. Jacobs E, Ehrhardt I, Dumke R. New insights in the outbreak pattern of *Mycoplasma pneumoniae*. *Int J Med Microbiol*. 2015; 305(7):705–708.
5. Bajantri B, Venkatram S, Diaz-Fuentes G. *Mycoplasma pneumoniae*: A potentially severe infection. *J Clin Med Res*. 2018; 10(7):535-544.
6. Kumar S, Garg IB, Sethi GR. *Mycoplasma pneumoniae* in community-acquired lower respiratory tract infections. *Indian J Pediatr*. 2018; 85(6):415-419.
7. Søndergaard MJ, Friis MB, Hansen DS, Jørgensen IM. Clinical manifestations in infants and children with *Mycoplasma pneumoniae* infection. *PLoS One*. 2018; 13(4):e0195288.
8. Atkinson TP, Balish MF, Waites KB. Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *FEMS Microbiol Rev*. 2008; 32:956-73.
9. Waites KB, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *ClinMicrobiol Rev*. 2004; 17(4):697-728.
10. Talkington DF, Waites KB, Schwartz SB, Besser RE, Waites KB. Emerging from obscurity: Understanding pulmonary and extrapulmonary syndromes, pathogenesis, and epidemiology of human *Mycoplasma pneumoniae* infections. En: Scheld WM, Craig WA, Hughes JM (ed). *Emerging Infections*. ASM Press, Washington, DC.: 2001. p. 57-84.
11. Wang IJ, Lee PI, Huang LM, Chen CJ, Chen CL, Lee WT. The correlation between neurological evaluations and neurological outcome in acute encephalitis: a hospital-based study. *Eur J Paediatr Neurol*. 2007; 11(2):63-69.

12. Guleria R, Nisar N, Chawla TC. *Mycoplasma pneumoniae* and central nervous system complications: a review. J Lab Clin Med. 2005; 146(2):55-63.
13. Bitnun A, Ford-Jones EL, Petric M. Acute childhood encephalitis and *Mycoplasma pneumoniae*. Clin Infect Dis. 2001; 32(12):1674-84.
14. Narita M. Classification of extrapulmonary manifestations due to *Mycoplasma pneumoniae* infection on the basis of possible pathogenesis. Front Microbiol. 2016; 7:23.
15. Shimizu T. Inflammation-inducing factors of *Mycoplasma pneumoniae*. Front Microbiol. 2016; 7:414.
16. Chaudhry R, Ghosh A, Chandolia A. Pathogenesis of *Mycoplasma pneumoniae*: An update. Indian J Med Microbiol. 2016; 34(1):7–16.
17. Dumke R, Jacobs E. Antibody response to *Mycoplasma pneumoniae*: Protection of host and influence on outbreaks? Front Microbiol. 2016; 7:39.
18. Powers JM, Johnson MD. Mycoplasma panencephalitis: a neuropathologic documentation. Acta Neuropathol. 2012; 124(1):143-8.
19. Al-Zaidy SA, MacGregor D, Mahant S, Richardson SE, Bitnun A. Neurological complications of PCR-proven *M. pneumoniae* infections in children: Prodromal illness duration may reflect pathogenetic mechanism. Clin Infect Dis. 2015; 61(7):1092-8.
20. Stamm B, Moschopoulos M, Hungerbuehler H, Guarner J, Genrich GL, Zaki SR. Neuroinvasion by *Mycoplasma pneumoniae* in acute disseminated encephalomyelitis. Emerg Infect Dis. 2008; 14(4):641-3.
21. Sánchez-Vargas FM, Gómez-Duarte OG. *Mycoplasma pneumoniae*-an emerging extra-pulmonary pathogen. ClinMicrobiol Infect. 2008; 14(2):105-17.
22. Amode R, Ingen-Housz-Oro S, Ortonne N, Bounfour T, Pereyre S, Schlemmer F, Bequignon E, Royer G, Wolkenstein P, Chosidow O. Clinical and histologic features of *Mycoplasma pneumoniae*-related erythema multiforme: A single-center series of 33 cases compared with 100 cases induced by other causes. J Am Acad Dermatol. 2018;79(1):110-117.

23. Wetter DA, Camilleri MJ. Clinical, etiologic, and histopathologic features of Stevens-Johnson syndrome during an 8-year period at Mayo Clinic. *Mayo Clin Proc.* 2010; 85(2):131-8.
24. Olson D, Watkins LK, Demirjian A, Lin X, Robinson CC, Pretty K, Benitez AJ, Winchell JM, Diaz MH, Miller LA, Foo TA, Mason MD, Lauper UL, Kupfer O, Kennedy J, Glodé MP, Kutty PK, Dominguez SR. Outbreak of *Mycoplasma pneumoniae*-associated Stevens-Johnson Syndrome. *Pediatrics.* 2015 ;136(2):e386-94.
25. Kurata M, Kano Y, Sato Y, Hirahara K, Shiohara T. Synergistic effects of *Mycoplasma pneumoniae* infection and drug reaction on the development of atypical Stevens-Johnson syndrome in adults. *ActaDermVenereol.* 2016; 96(1):111-3.
26. Gouveia C, Evangelista V, Almeida R, Martins Baptista A. Immune thrombocytopenia associated with *Mycoplasma pneumoniae* infection. *EJCRIM.* 2018;5.
27. Khan FY, Ayassin M. *Mycoplasma pneumoniae* associated with severe autoimmune hemolytic anemia: case report and literature review. *Braz J Infect Dis.* 2009; 13:77-79.
28. Kuźma-Mroczkowska E, Pańczyk-Tomaszewska M, Szmigielska A, Szymanik-Grzelak H, Roszkowska-Blaim M. *Mycoplasma pneumoniae* as a trigger for Henoch-Schönlein purpura in children. *Cent Eur J Immunol.* 2015; 40(4):489-92.
29. Terraneo L, Lava SA, Camozzi P, Zgraggen L, Simonetti GD, Bianchetti MG, Milani GP. Unusual eruptions associated with *Mycoplasma pneumoniae* respiratory infections: Review of the literature. *Dermatology.* 2015; 231(2):152-7.
30. Tang Y, Yan W, Sun L, Huang J, Qian W, Hou M, Lv H. Kawasaki disease associated with *Mycoplasma pneumoniae*. *Ital J Pediatr.* 2016; 42(1):83.
31. Lee MN, Cha JH, Ahn HM, Yoo JH, Kim HS, Sohn S, Hong YM. *Mycoplasma pneumoniae* infection in patients with Kawasaki disease. *Korean Journal of Pediatrics.* 2011; 54(3):123-127.
32. Daxboeck F, Krause R, Wenisch C. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *ClinMicrobiol Infect.* 2003; 9(4):263.
33. Loens K, Goossens H, Ieven M. Acute respiratory infection due to *Mycoplasma pneumoniae*: current status of diagnostic methods. *Eur J ClinMicrobiol Infect Dis.* 2010; 29(9):1055-1069.

34. Waites KB. ¿What's new in diagnostic testing and treatment approaches for *Mycoplasma pneumoniae* infections in children? Hot Top Infect Immun Child V. New York: Springer; 2011:45–57.
35. 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):1-9.
36. Ling CL, McHugh TD. Rapid detection of atypical respiratory bacterial pathogens by real-time PCR. *Methods Mol Biol.* 2013; 943:125-33.
37. Winchell JM, Mitchell SL. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by real-time PCR. *Methods Mol Biol.* 2013; 943:149-158.
38. Daxboeck F. *Mycoplasma pneumoniae* central nervous system infections. *Curr Opin Neurol.* 2006; 19(4):374-8.
39. Narita M, Yamada S. Two distinct patterns of central nervous system complications due to *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Clin Infect Dis.* 2001; 33(6):916-917.
40. Narita M, Itakura O, Matsuzono Y, Togashi T. Analysis of mycoplasmal central nervous system involvement by polymerase chain reaction. *Pediatr Infect Dis J.* 1995; 14(3):236-7.
41. Montagnani F, Rossetti B, Vannoni A, Cusi MG, De Luca A. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections: data analysis from clinical practice. *New Microbiol.* 2018; 41(2).
42. Godron A, Pereyre S, Monet C, Llanas B, Harambat J. Hemolytic uremic syndrome complicating *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Pediatr Nephrol.* 2013; 28(10):2057-60.
- Y 43. Jujaray D, Juan LZ, Shrestha S, Ballgobin A. Pattern and significance of asymptomatic elevation of liver enzymes in *Mycoplasma pneumoniae* in children. *Clin Pediatr (Phila).* 2018; 57(1):57-61.

XVII. ANEXOS

Anexo 1. Definiciones operacionales.

DIAGNÓSTICO	DEFINICIÓN OPERACIONAL
Encefalitis aguda	La definición de encefalitis aguda se realizará de acuerdo al Consorcio Internacional de Encefalitis del 2014: Estado mental alterado (disminución o alteración del nivel de conciencia, letargo o cambio de personalidad) por más de 24 horas sin causa alternativa identificada, más ≥ 2 de los siguientes para un diagnóstico "posible" o ≥ 3 para un diagnóstico "probable": 1) Fiebre documentada $\geq 38^{\circ}\text{C}$ dentro de las 72 horas (antes o después) 2) Crisis convulsivas generalizados o parciales que no son totalmente atribuibles a un trastorno convulsivo preexistente 3) Nuevos hallazgos neurológicos focales de inicio 4) Leucocitos ≥ 5 células/microL en LCR 5) Neuroimagen sugestiva de encefalitis 6) Electroencefalograma (EEG) con datos que sugieran encefalitis
Meningitis aséptica	Evidencia de inflamación meníngea por clínica (fiebre, cefalea, signos meníngeos) y laboratorio (pleocitosis, proteinorraquia) con cultivos bacterianos de rutina negativos.
Mielitis transversa	Se definirá mielitis transversa a la presencia de: - Disfunción bilateral (no necesariamente simétrica) sensorial, motora o autonómica de la médula espinal, con un nivel sensitivo claramente definido. - Inflamación de la médula espinal (LCR con pleocitosis o índice de IgG elevado o resonancia magnética con realce de gadolinio en médula) - Progresión hasta un nadir de déficit clínico entre 4 horas y 21 días después de inicio de los síntomas - Exclusión de etiología compresiva, radiación, neoplásica y vascular.
Encefalopatía diseminada	La definición de encefalopatía diseminada aguda se basará en el

<p>aguda</p>	<p>Grupo Internacional de Estudio de Esclerosis Múltiple Pediátrica del 2012 como el primer ataque clínico polifocal de enfermedad desmielinizante del sistema nervioso central, que no puede explicarse por fiebre, enfermedad sistémica o síntomas postictales, con una resonancia magnética (RM) cerebral anormal durante la fase aguda (tres meses), sin nuevos hallazgos clínicos y de RM tres meses o más después del inicio.</p> <p>En RM cerebral normalmente se muestran lesiones grandes (>1 a 2 cm), difusas, mal delimitadas que afectan predominantemente a la sustancia blanca, puede haber lesiones de sustancia gris profunda (ej. tálamo o ganglios basales), y las lesiones hipointensas en T1 de la sustancia blanca son raras.</p>
<p>Cerebelitis/ataxia cerebral aguda</p>	<p>Inicio súbito de alteración en la marcha, desde ampliación de la base de sustentación hasta incapacidad para la misma, que se puede acompañar de dismetría, temblor intencional, hipotonía y nistagmo, sin signos de hipertensión intracraneal, alteración del estado mental, convulsiones, meningismo, opsoclono mioclono, debilidad, pérdida sensorial, reflejos anormales ni otros datos de enfermedad sistémica como fiebre.</p>
<p>Síndrome de Guillain Barré</p>	<p>Debilidad muscular, rápidamente progresiva, de comienzo distal y avance proximal, con simetría relativa, reflejos tendinosos profundos disminuidos o ausentes y con signos sensitivos leves o ausentes. Apoyado en el análisis LCR (disociación albúmino-citológica), electrodiagnóstico (disminución de la velocidad de conducción) neuroimagen (realce de las raíces nerviosas espinales y la cola de caballo en RM) con la exclusión de diagnósticos alternativos.</p>
<p>Síndrome de Miller Fisher</p>	<p>Se definirá por la tríada de ataxia, debilidad con arreflexia y oftalmoparesia. Puede presentar anticuerpos IgG anti-GQ1b (gangliósido).</p>
<p>Neuropatías craneales/periféricas</p>	<p>Debilidad, pérdida sensorial y/o presencia de síntomas sensoriales como parestesias, dolor o sensación de ardor, en el trayecto de un nervio craneal o periférico, apoyado en estudios de electrodiagnóstico.</p>
<p>Anemia hemolítica autoinmune</p>	<p>Evidencia de hemólisis (anemia, bilirrubina indirecta alta, lactato deshidrogenasa elevada elevada, haptoglobina baja) y prueba de</p>

	antiglobulina directa positiva.
Síndrome hemofagocítico	<p>Se definirá cuando presente 5 de los 8 criterios clínicos de la Sociedad del Histiocito:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Fiebre $\geq 38.5^{\circ}\text{C}$ 2. Esplenomegalia 3. Citopenias que afecten 2 o 3 líneas en sangre periférica: Hemoglobina $< 9\text{mg/dl}$, plaquetas $< 100,000/\text{microL}$, neutrófilos $< 1,000/\text{microL}$ 4. Triglicéridos en ayuno $> 265\text{ mg/dl}$ ó fibrinógeno $< 1.5\text{ g/l}$ 5. Hemofagocitosis en médula ósea, ganglios, bazo o hígado 6. Niveles bajos o ausencia de actividad de células NK 7. Ferritina $> 500\text{ }\mu\text{g/l}$ 8. CD 25 soluble $> 2,400\text{ U/ml}$ <p>Sin evidencia de malignidad, sin una mutación familiar conocida o enfermedad autoinmune.</p>
Púrpura trombocitopenica inmune	Aparición repentina de petequias o hematomas sin otros signos o síntomas sistémicos, con trombocitopenia ($< 100,000/\text{microL}$) aislada, frotis de sangre periférica sin alteraciones como hemolisis o blastos), prueba de antiglobulina directa negativa, habiendo descartando otras causas de trombocitopenia.
Púrpura de Henoch-Schönlein	<p>Púrpura palpable sin trombocitopenia o coagulopatía y ≥ 2 de las siguientes manifestaciones clínicas:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Artritis o artralgiás, transitorias, no migratorias 2. Dolor abdominal o hemorragia gastrointestinal 3. Manifestaciones renales desde hematuria aislada microscópica hasta la glomerulonefritis rápidamente progresiva.
Síndrome de Stevens-Johnson Necrosis epidérmica tóxica	Necrosis y desprendimiento de la epidermis de grado de extensión variable, caracterizado por pródromo febril de inicio agudo y malestar general con posterior aparición de lesiones cutáneas, las cuales pueden ser máculas eritematosas, eritema difuso o lesiones en diana que progresan a ampollas dolorosas, con signo Nikolsky positivo. Con conjuntivitis, estomatitis o mucositis genital dolorosa. Abarcan menos

	del 10% de la superficie corporal en SSJ y más del 30% en el caso de NET.
Eritema multiforme	Presencia de lesiones tipo diana en la piel, que pueden estar acompañadas de erosiones o ampollas en mucosas (eritema multiforme mayor) o sin ellas (eritema multiforme menor).
Miocarditis	Signos y síntomas de disfunción cardíaca, con aumento en biomarcadores cardíacos (ej. troponina), cambios electrocardiográficos sugestivos de lesión aguda del miocardio o arritmia y evidencia ecocardiográfica de disfunción cardíaca sin un defecto cardíaco estructural subyacente. La cual puede ser confirmada por resonancia magnética con gadolinio o biopsia de miocardio.
Pericarditis	Pericarditis aguda se definirá de acuerdo a la Sociedad Europea de Cardiología 2015, con la presencia de al menos dos de los siguientes criterios: <ol style="list-style-type: none"> 1. Dolor torácico típico (agudo y pleurítico, que mejora al sentarse e inclinarse hacia adelante) 2. Frote pericárdico 3. Cambios sugestivos en el electrocardiograma (típicamente elevación del segmento ST generalizada) 4. Nuevo o incremento del derrame pericárdico
Hepatitis aguda	Inflamación aguda del hígado, que se documenta por un incremento de las transaminasas Descartando la infección por hepatitis A, B, C, VEB, parvovirus, citomegalovirus, virus de inmunodeficiencia humana, causas autoinmunes, medicamentos o enfermedad injerto contra huésped.
Pancreatitis aguda	Se definirá pancreatitis aguda con dos de los tres a los criterios de Atlanta: <ol style="list-style-type: none"> 1) inicio agudo de dolor epigástrico intenso y persistente que puede irradiarse a la espalda 2) elevación de la lipasa o amilasa sérica hasta tres veces o más que el límite superior de la normalidad 3) hallazgos característicos de pancreatitis aguda en imágenes

	<p>(tomografía computarizada con contraste, resonancia magnética o ultrasonido abdominal.</p> <p>Se incluirá el primer episodio. Descartando las causas traumáticas, por medicamentos (L-aspar), obstructivas, por hipertrigliceridemia y alcohólica.</p>
Enfermedad de Kawasaki	<p>Se definirá enfermedad de Kawasaki a la presencia de fiebre por ≥ 5 días, con al menos cuatro de los cinco siguientes hallazgos físicos:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Inyección conjuntival bulbar bilateral, no exudativa. 2. Cambios en la mucosa oral como labios eritematosos o fisurados, faringe hiperémica o lengua de la fresa. 3. Cambios en las extremidades como eritema de palmas o plantas, edema de manos o pies y descamación periungueal. 4. Exantema polimorfo. 5. Linfadenopatía cervical ≥ 1.5cm de diámetro. <p>Que no puedan ser explicados por otra etiología.</p>
Artritis	<p>Síntomas y signos de inflamación localizados en una articulación, con cultivo de bacterias o tinción de Gram negativos.</p>

Anexo 2. Variables del estudio

VARIABLE	TIPO	VALOR
Género	Cualitativa nominal dicotómica	femenino (=1); masculino (=0)
Edad al diagnóstico	Cuantitativa de escala discreta	Meses
Lugar de procedencia	Cualitativa nominal policotómica	Abierta
Patología de base	Cualitativa nominal policotómica	Abierta
Cuadro respiratorio	Cualitativa nominal policotómica	Ninguna (=0); neumonía (=1) Infección vía aéreas superior (=3)
Tiempo de presentación del cuadro respiratorio	Cualitativa nominal dicotómica	Previo (=1); actual (=2)
Días antes	Cuantitativa escala discreta	Días
Fecha inicio cuadro respiratorio	Cuantitativa escala discontinua	dd/mm/aaaa
Fecha término cuadro respiratorio	Cuantitativa escala discontinua	dd/mm/aaaa
Duración del cuadro respiratorio	Cuantitativa escala discreta	Días
Fiebre con cuadro respiratorio	Cualitativa nominal dicotómica	Si (=1); No (=0)
Temperatura máxima	Cuantitativa de escala continua	Grados centígrados
Tos	Cualitativa nominal dicotómica	Si (=1); No (=0)
Rinorrea	Cualitativa nominal dicotómica	Si (=1); No (=0)
Odinofagia	Cualitativa nominal dicotómica	Si (=1); No (=0)
Frecuencia respiratoria máxima durante el cuadro respiratorio	Cuantitativa escala discreta	Respiraciones por minuto
Datos de dificultad respiratoria	Cualitativa nominal policotómica	Ninguno(=0); aleteo nasal (=1); retracción xifoidea (=2); tiraje intercostal (=3); quejido (=4); disociación toraco-abdominal (=5)
Saturación de oxígeno mínima durante el cuadro respiratorio	Cuantitativa escala discreta	Porcentaje
Auscultación	Cualitativa nominal policotómica	normal (=1); sibilancias (=2); estertores (=3); hipoventilación

		(=4)
Radiografía de tórax	Cualitativa nominal policotómica	Normal (=1); consolidación (=2); infiltrado intersticial (=3); atelectasia (=4); derrame (=5) ; focos múltiples (=6)
Neurológico	Cualitativa nominal policotómica	No (=0); Encefalitis aguda (=1); Meningitis aséptica (=2); Mielitis transversa (=3); Encefalopatía diseminada aguda (=4); Cerebelitis/ataxia cerebral aguda (=5); Síndrome de Guillain Barré (=6); Síndrome de Miller Fisher (=7); Neuropatías craneales/periféricas (=8)
Hematológico	Cualitativa nominal policotómica	No (=0); anemia hemolítica autoinmune (=1); síndrome hemofagocítico (=2); Púrpura trombocitopenica inmune (=3); Púrpura de Henoch-Schönlein (=4)
Dermatológico	Cualitativa nominal policotómica	No (=0); Stevens-Johnson (=1); Necrosis epidérmica tóxica (=2); Eritema multiforme (=3)
Cardiológico	Cualitativa nominal policotómica	No (=0); Miocarditis (=1) Pericarditis (=2)
Gastrohepático	Cualitativa nominal policotómica	No (=0) ; Hepatitis (=1) Pancreatitis (=2)
Inmunológico	Cualitativa nominal policotómica	No (=0); Enfermedad de Kawasaki (=1); Artritis (=2)
Fecha inicio extrapulmonar	Cuantitativa escala discontinua	dd/mm/aaaa
Fecha término extrapulmonar	Cuantitativa escala discontinua	dd/mm/aaaa

Duración extrapulmonar	Cuantitativa escala discreta	Días
Fiebre con extrapulmonar	Cualitativa nominal dicotómica	Si (=1); No (=0)
Fecha ingreso	Cuantitativa escala discontinua	dd/mm/aaaa
Fecha egreso	Cuantitativa escala discontinua	dd/mm/aaaa
Días estancia hospitalaria		Días
Servicio hospitalización	Cualitativa nominal policotómica	Urgencias (=1); sala (=2); piso (=3)
Ingreso UTIP	Cualitativa nominal dicotómica	Si (=1); No (=0)
Fecha ingreso UTIP	Cuantitativa escala discontinua	dd/mm/aaaa
Fecha egreso UTIP	Cuantitativa escala discontinua	dd/mm/aaaa
Días estancia UTIP	Cuantitativa escala discreta	Días
Diagnóstico egreso	Cualitativa nominal policotómica	Describir
Complicaciones	Cualitativa nominal dicotómica	Si (=1); No (=0)
Secuelas	Cualitativa nominal dicotómica	Si (=1); No (=0)
Mortalidad	Cualitativa nominal dicotómica	Vivo (=1); 2=muerto (=2)
Fecha defunción	Cuantitativa escala discontinua	dd/mm/aaaa
Motivo defunción	Cualitativa nominal policotómica	Describir
Tratamiento antibiótico	Cualitativa nominal policotómica	Describir
Duración tratamiento	Cuantitativa escala discreta	Días
Hemoglobina	Cuantitativa de escala continua	gr/dl
Eritrocitos	Cuantitativa de escala discreta	cel/mm ³
Leucocitos	Cuantitativa de escala discreta	cel/mm ³
Neutrofilos	Cuantitativa de escala discreta	cel/mm ³
Linfocitos	Cuantitativa de escala discreta	cel/mm ³
Plaquetas	Cuantitativa de escala discreta	cel/mm ³
Proteína C reactiva	Cuantitativa de escala continua	mg/dl
Procalcitonina	Cuantitativa de escala continua	ng/ml
PCR <i>M. pneumoniae</i>	Cualitativa nominal dicotómica	Positivo (=1); negativo (=2)
Serología <i>M. pneumoniae</i>	Cualitativa nominal dicotómica	Positivo (=1); negativo (=2)

Anexo 3. Hoja de recolección de datos.

Título: Detección de *Mycoplasma pneumoniae* en cuadros extrapulmonares en pacientes pediátricos.

Fecha:

No.	Nombre paciente			()	Exp
Género M / F	Fecha nacimiento			Edad (meses)	
Procedencia	Patología base				
RESPIRATORIO					
Cuadro no/ IVAS / neumonía	Tiempo presentación	Previo / actual	Días antes		
Fecha inicio	Fecha término	Duración			
Fiebre SI /NO	T max °C	Tos SI /NO	Rinorrea SI /NO	Odinofagia SI /NO	FR: rpm
DDR	0=ninguno 1=aleteo 2=xifoidea 3=intercostal 4= quejido 5=disociación			SaO2:	%
Auscultación	1=normal 2=sibilancias 3=estertores 4=hipoventilación	Rx tórax	1=normal 2=consolidación 3=infiltrado intersticial 4=atelectasia 5=derrame 6=focos múltiples		
Otras					
MANIFESTACIÓN EXTRAPULMONAR					
Neurológico	0=No 1=Encefalitis 2=Meningitis aséptica 3=Mielitis transversa 4=Encefalopatía diseminada aguda 5=Cerebelitis/ataxia cerebral aguda 6=Síndrome de Guillain Barré 7=Síndrome de Miller Fisher 8=Neuropatías craneales/periféricas.				
Hematológico	0=No 1=Anemia hemolítica autoinmune 2=Síndrome hemofagocítico 3=Púrpura trombocitopenica inmune 4=Púrpura de Henoch-Schönlein.				
Dermatológico	0=No 1=Stevens-Johnson 2=Necrosis epidérmica tóxica 3=Eritema multiforme.				
Cardiológico	0=No 1=Miocarditis 2=Pericarditis				
Gastrohepático	0=No 1=Hepatitis 2=Pancreatitis				
Inmunológico	0=No 1=Enfermedad de Kawasaki 2=Artritis				
Otra					
Fecha inicio sx	Fecha resolución sx	Duración (días)			
Fecha ingreso	Fecha egreso	DEIH			
Servicio de hospitalización	1= Urgencias 2=Sala 3=Piso ()		Fiebre si/no	Tmax °C	
Ingreso UTIP	SI /NO	Fecha ingreso:	Fecha egreso:	DEIH UTIP	
Diagnóstico egreso					
Complicaciones	SI/NO	Definir:			
Secuelas	SI / NO	Definir secuelas:			
Mortalidad	Vivo/ muerto	Fecha defunción:		Motivo defunción:	
Tratamiento anti MPN (desde inicio sx)	SI / NO	Nombre:	Fecha inicio:	Fecha término:	Duración:
		Nombre:	Fecha inicio:	Fecha término:	Duración:

Título: Detección de *Mycoplasma pneumoniae* en cuadros extrapulmonares en pacientes pediátricos.

Fecha:

LABORATORIOS			
Fecha de la toma	Hb gr/dl, Eritro Lin cel/mm3, Mon	cel/mm3, Leucos cel/mm3, Eo	cel/mm3, Neu cel/mm3, Bandas cel/mm3, %, Plaquetas
Otros	Fecha (dd/mm/aa)	Resultado	
PCR			
Procalcitonina			
PCR MPN ANF			
PCR PMN extra			
Serología 1 IgG IgM			
Serología 2 IgG IgM			
Otros cultivos			