
VALIDEZ DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA EL DIAGNÓSTICO DE INFECCIONES RESPIRATORIAS PRODUCIDAS POR *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*: META-ANÁLISIS

Jesús Hernando Díaz¹, Olga L. Sarmiento¹, Claudia Liliana Satizábal¹,
María del Pilar Delgado², Carlos Alberto Jaramillo², Santiago Ucrós³,
María Fernanda Mojica², Oscar Andrés Martínez¹,
Paula Natalia Rey², Freddy Jean Karlo Toloza Bonilla¹

RESUMEN

Introducción. *Mycoplasma pneumoniae* es considerado un frecuente agente etiológico de infecciones respiratorias y de una amplia gama de manifestaciones extra-pulmonares. Pruebas diagnósticas con baja exactitud y validez llevaron a considerar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico de *M. pneumoniae*. **Objetivo:** Evaluar la validez y la exactitud de la PCR para la detección de *M. pneumoniae*. **Materiales y Métodos:** Meta-análisis de estudios que evaluaron el diagnóstico de *M. pneumoniae* en tracto respiratorio por PCR, publicados en MEDLINE desde noviembre de 1966 hasta julio de 2009. El análisis estadístico incluyó: *i*) cálculo de sensibilidad y especificidad de la PCR; *ii*) prueba de homogeneidad de estimadores entre estudios; *iii*) elaboración de *summary receiver operating characteristic curves* (SROC) por un modelo de regresión lineal; *iv*) método de Egger para evaluar sesgo de publicación. **Resultados:** De 44 estudios incluidos los cuales incluyeron 6111 pacientes se calculó una sensibilidad de 0,72 (rango 0,21-0,99) y una especificidad de 0,96 (rango 0,06-0,99). Estudios en los cuales se incluyeron solo niños la PCR mostró menor exactitud. Estudios con concentraciones de cloruro de magnesio mayores de 1,5 mM mostraron mayor exactitud. **Conclusiones:** Según los resultados de este estudio, la PCR no se recomienda como prueba rutinaria. Sin embargo, en casos con alta sospecha clínica de infección por *M. pneumoniae* en servicios de salud con alta prevalencia, la PCR es de utilidad. Estudios futuros deben reportar el espectro de la enfermedad y los resultados deben ser reportados por tipo de muestra y de acuerdo a los diferentes puntos de corte de la prueba de referencia utilizada.

Palabras clave: Meta-análisis, *Mycoplasma pneumoniae*, PCR, Infección, Sensibilidad y Especificidad.

¹ Universidad de los Andes, Facultad de Medicina, Cra 1 No 18A-10, Edificio Q, Oficina-Q811, Bogotá, Colombia. MD (Drs. Díaz y Martínez), MD, MPH, PhD (Dra. Sarmiento), PhD (Dra. Satizábal), estudiante de medicina (Sr. Toloza).

² Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias, Carrera 1 No. 18A-10, Edificio J, Laboratorio J203, Bogotá, Colombia. MSc (Sras. Delgado y Mojica, Sr. Jaramillo), MPH (Sra. Rey).

³ Departamento de Pediatría, Fundación Santa Fe de Bogotá, Avenida 7 No 118-09, Bogotá, Colombia. MD, Esp Neumología pediátrica.

POLYMERASE-CHAIN REACTION VALIDITY FOR DIAGNOSIS OF RESPIRATORY INFECTIONS CAUSED BY *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*: META-ANALYSIS

ABSTRACT

Introduction: *Mycoplasma pneumoniae* is considered an important cause of respiratory infections with a wide range of extra-pulmonary manifestations. Difficulties in diagnosis of *M. pneumoniae* by culture and/or serology, have led to consider the Polymerase Chain Reaction (PCR) as a diagnostic test. **Objective:** To evaluate the validity and accuracy of PCR for detection of *M. pneumoniae*. **Materials and Methods:** A meta-analysis was performed including molecular diagnostic studies of *M. pneumoniae* in respiratory tract by PCR, published in the MEDLINE database from 1966 until June 2009. Statistical analysis included *i*) the calculation of sensitivity and specificity for PCR, *ii*) Cochran homogeneity test (Q), *iii*) summary receiver operating characteristic (SROC) curves for a linear regression model and *iv*) Egger's method for publication bias. **Results:** Forty-four studies including 6111 patients were included. Average sensitivity value was 0.72 and specificity was 0.96 with ranges between 0.66 to 0.87 and 0.95 to 0.98, respectively. PCR was more accurate in studies including adults, compared to those including children only. Magnesium chloride concentration greater than 1.5mM showed better accuracy. **Conclusion:** PCR is not recommended for routine clinical practice. However, it could be useful in highly suspicious cases of infection by *M. pneumoniae* in health settings with high prevalence. Future studies should report the spectrum of the disease, results by type of respiratory sample and results reported by cut points of the standard reference.

Keywords: Meta-Analysis, *Mycoplasma pneumoniae*, Polymerase Chain Reaction, Infection, Sensitivity and Specificity.

INTRODUCCIÓN

Mycoplasma pneumoniae ha emergido como una frecuente causa de infecciones respiratorias, principalmente de la neumonía adquirida en la comunidad (NAC) (1). Su incidencia es tanto endémica como epidémica (2). Este fenómeno es favorecido por la transmisión entre pacientes asintomáticos (1). *M. pneumoniae* ha sido reportado como causa de infecciones respiratorias en Europa (3), Asia (4), Estados Unidos (5), África (6) y países en vías de desarrollo. *M. pneumoniae* puede afectar a diferentes grupos etáreos, presentando una alta prevalencia en la población infantil especialmente

en la población de preescolares (7). La prevalencia de neumonía causada por *M. pneumoniae* varía ampliamente, encontrándose datos que describen dicha prevalencia como baja y cercana al 5% (8) y otros que han estimado una prevalencia del 42% (9). Se ha reportado que *M. pneumoniae* es responsable hasta del 78% de los casos de neumonía fatal en niños (10), lo cual resalta la importancia de tener una prueba con una sensibilidad y especificidad adecuadas para detectarlo.

El diagnóstico diferencial de neumonía por *M. pneumoniae* está basado en el criterio clínico y en pruebas diagnósticas como cultivo, detección

antigénica, serología y detección mediante pruebas moleculares (11). El diagnóstico clínico tiene baja especificidad debido al número de posibles etiologías (12). El cultivo se caracteriza por requerir alta pericia en la realización del proceso, un período de incubación largo (más de 4 semanas), una sensibilidad baja por altos requerimientos de inóculo y una especificidad baja debido a portadores prolongados después de la infección activa (13). La detección antigénica por pruebas serológicas presenta problemas debido a la presencia de reacciones cruzadas, por ejemplo con flora comensal (11). Las pruebas serológicas son ampliamente utilizadas, a pesar de presentar reacciones cruzadas, y de los problemas en dilucidar la presentación de una enfermedad aguda de una infección resuelta (7,14).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tiene el potencial de ser el estándar de oro para el diagnóstico de neumonía por *M. pneumoniae* debido a la rápida obtención de resultados, identificación de varios patógenos a la vez y ser menos afectada por uso previo de antibióticos(15). Sin embargo, actualmente su utilidad se ha limitado a análisis cualitativos alrededor de la variabilidad en sensibilidad, especificidad y reproducibilidad y los análisis cuantitativos son limitados (7,11,15). Zahng L y col. publicaron un meta-análisis evaluando PCR para el diagnóstico de infección por *M. pneumoniae* (92). Sin embargo, tiene limitaciones debido al escaso número de estudios incluidos y la falta de evaluación de la heterogeneidad asociada al punto de corte en las pruebas de serología (92).

En este contexto, el objetivo del presente meta-análisis es evaluar la validez y la exactitud de la PCR para realizar la detección de *M. pneumoniae*, e identificar posibles factores asociados con diferencias en su exactitud y validez. Los resultados de este análisis son de gran importancia en la toma de

decisiones en el diagnóstico clínico de infecciones respiratorias por *M. pneumoniae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estrategia de búsqueda: Se realizó una búsqueda sistemática en la base de datos MEDLINE de estudios potencialmente relevantes para el diagnóstico de *M. pneumoniae* por PCR, publicados desde 1966 hasta junio de 2009. Se utilizaron los siguientes términos en la búsqueda: “*Mycoplasma pneumoniae*” y “*Polymerase Chain Reaction*” o “PCR”. Solo artículos escritos en inglés o español fueron revisados. La búsqueda fue restringida a estudios con muestras humanas del tracto respiratorio y se clasificaron según la edad de la población en niños (si solo incluían individuos menores de 18 años) o adultos y/o niños (si incluían individuos ≥ 18 años). A su vez, el tipo de muestra fue estratificada de acuerdo al origen del tracto respiratorio inferior (lavado bronquioalveolar, aspirado bronquioalveolar y esputo) y superior (frotis nasofaríngeo o frotis faríngeo). Artículos de reporte de casos, editoriales, cartas al editor o revisiones fueron excluidos de la evaluación. Artículos en los que se identificaron análisis discrepante (reasignación de resultados con base a una prueba arbitraria) fueron también excluidos (16). Dos investigadores de forma independiente seleccionaron los resúmenes relevantes de acuerdo con las estrategias de búsqueda.

Criterios de inclusión: Los criterios de inclusión de los estudios fueron: detección directa de *M. pneumoniae* por medio de técnicas de PCR, resultados con un mínimo de 10 pacientes o muestras y reporte del estándar de referencia para calcular sensibilidad y especificidad. Se analizó si la evaluación fue realizada ciega de acuerdo con el conocimiento de los investigadores del resultado del estándar de referencia. Dos autores evaluaron

revisión de cada estudio corresponde al reportado por cada autor.

Análisis estadístico: La exactitud de los estudios se definió con base en los parámetros diagnósticos de sensibilidad, especificidad y razón de ventajas de diagnóstico (*diagnostic odds ratio* o DOR). Intervalos de confianza exactos de 95% se calcularon para la sensibilidad y la especificidad. Inicialmente se analizó la exactitud de la PCR comparándola con los resultados de la serología, cultivo y PCR. De acuerdo con el consenso; se definió como serología positiva: a) toda prueba en que la detección de anticuerpos anti-*M. pneumoniae* de tipo IgM fuera posible, b) todo caso de seroconversión de negativo a positivo y c) los casos en que se presentó un aumento de al menos 4 veces en el título de anticuerpos IgG específicos. Los parámetros fueron estratificados de acuerdo al reporte de la unidad de análisis (pacientes o muestras).

La heterogeneidad de los parámetros de validez y exactitud de la PCR reportados en los estudios fue evaluada por la prueba de homogeneidad Cochran (Q) y el modelo de meta-regresión. La meta-regresión se realizó con el modelo de efectos aleatorios (17). Se construyeron curvas ROC de resumen (*summary receiver operating characteristic curves* o SROC) asimétricas para representar el umbral diagnóstico de los estudios. Las curvas SROC fueron construidas aplicando el modelo de regresión lineal $D = A + BS$ (18), donde D es el logaritmo natural de DOR para cada estudio. El DOR se define como la razón de la probabilidad de positividad de la prueba en presencia de la enfermedad con respecto a la probabilidad de positividad en ausencia de dicha enfermedad. El DOR se calcula del cociente entre la razón de un resultado positivo en pacientes con *M. pneumoniae* (sensibilidad/[1-sensibilidad] o likelihood positivo (LR +)) y la razón de un resultado positivo en pacientes sin *M. pneumoniae* ([1-especificidad]/especifici-

dad o Likelihood ratio negativo (-)) (ver Figura 2 para fórmula y sus equivalencias). El intercepto A representa el DOR combinado. S es la variación de DOR entre los estudios dado por los diferentes umbrales diagnósticos y por tanto una medida del umbral para considerar una prueba como positiva. Un valor negativo de S, indica que el umbral usado favorece valores altos de especificidad con disminución de la sensibilidad y viceversa. B es el coeficiente de regresión de S. El modelo final fue convertido a los ejes convencionales de la curva ROC. Todos los modelos fueron ajustados por el año de publicación (antes y después del 2004), país donde fue realizado el estudio (Estados Unidos versus otros países), la edad de la población en estudio y estándar de referencia.

El DOR relativo (*relative diagnostic odds ratio* o RDOR) se empleó para valorar las variables que explicaban la heterogeneidad. Por esta razón se estratificaron por co-variables en el modelo SROC. El RDOR se obtuvo con el cociente del DOR de cada estrato. Un RDOR igual a uno implica que la co-variable no afecta el DOR combinado. Un RDOR mayor a 1 significa que el estudio con la característica tiene mayor DOR que estudios sin la característica y viceversa para RDOR menores a 1.

Por el método de Egger, se evaluó sesgo de publicación. Este método consiste en una regresión lineal en escala logarítmica de los índices de exactitud contra la precisión (inverso del error estándar (19)).

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando STATA, versión 9.1.

RESULTADOS

De 361 referencias se seleccionaron 97 artículos para su revisión completa. De estos, 28 artículos

$$\text{"DOR="} \frac{\text{"VP/FN"}}{\text{"FP/VN"}} = \frac{[\text{Sensibilidad}/(1-\text{Sensibilidad})]}{[(1-\text{Especificidad})/\text{Especificidad}]} = \frac{\text{LR (+)}}{\text{LR (-)}}$$

Verdaderos positivos (VP), falsos negativos (FN), falsos positivos (FP), Likelihood ratio positivo (LR (+)), Likelihood ratio negativo (LR (-)).

Figura 2. Fórmula de la razón de ventajas de diagnóstico (*diagnostic odds ratio* o DOR) y sus equivalencias

reportaron datos insuficientes para calcular la sensibilidad y especificidad de la PCR para el diagnóstico de *M. pneumoniae*. Un total de 69 estudios publicados entre noviembre de 1989 hasta Junio de 2009 cumplieron con los criterios de inclusión para el meta-análisis (5,20-87). El criterio más frecuente de exclusión de los estudios fue la insuficiencia de datos para calcular la sensibilidad y especificidad (42%); seguido de artículos que eran revisiones, comentarios, cartas o reporte de casos (25%), estudios que no utilizaron muestras respiratorias (24%), estudios con resultados de menos de 10 pacientes o muestras (7,5%) y estudios con análisis discrepante (0,5%).

Criterios de calidad de los estudios: Ninguno de los 69 estudios cumplió con todos los criterios de reporte y métodos de investigación para evaluar la PCR como prueba diagnóstica (Tabla 1). Los estudios fueron estratificados por número de muestras (36%) y pacientes (64%), para un total de 5237 y 6111, respectivamente. Los estudios que reportaron los parámetros de exactitud por número de pacientes fueron el principal objeto del análisis de este estudio dado que estos estudios contribuyen con mejor evidencia para la evaluación de la validez de la PCR en la práctica clínica.

Sensibilidad y especificidad de la PCR. Tanto la sensibilidad como la especificidad de la PCR fueron altamente variables con amplios intervalos de confianza (Figura 3). Comparado

con la especificidad, los resultados de sensibilidad fueron más variables y bajos. Veintidós estudios tuvieron sensibilidad y especificidad superior a 90%, de los cuales 9 reportaron los resultados en número de pacientes. En 68% de los estudios, la sensibilidad fue inferior a 90%, mientras que 38% de los estudios presentaron especificidades menores a 90%. El 77% de los estimadores de precisión se localizaron en el cuadrante superior derecho del espacio ROC (Figura 4). Estudios que incluyeron adultos demostraron tener mayor exactitud diagnóstica (sensibilidad [83,6%] y especificidad [96,6%]) en comparación con estudios que solo incluyeron muestras provenientes de niños (sensibilidad [65,8%] y especificidad [96%]). En este caso el RDOR (4,85) mostró diferencias en exactitud diagnóstica entre los grupos de edad (estudios que incluyeron niños y adultos versus estudios de solo niños $p=0,025$) (Tabla 2).

Exactitud diagnóstica de PCR por tipo de espécimen respiratorio. Los estudios que utilizaron exclusivamente muestras del tracto respiratorio superior presentaron una exactitud diagnóstica (sensibilidad [67,5%] y especificidad [96,3%]) similar a los estudios que utilizaron muestras conjuntas de tracto respiratorio superior y/o inferior (sensibilidad [79,6%] y especificidad [94,8%]). El RDOR (0,87) no demostró diferencia estadística significativa ($p=0,736$) entre muestras del tracto respiratorio superior e inferior (Tabla 2).

Tabla 1. Número y porcentaje de estudios que cumplieron con los criterios de calidad para reporte que evalúan la PCR como prueba diagnóstica.

VARIABLE	No. estudios = 69	
	n	%
Tipo de estudio (prospectivo, retrospectivo)	69	100
Población en estudio		
Año de publicación	69	100
País de publicación	69	100
Edad de los pacientes	48	70
Características clínicas del grupo enfermo	46	66
Características clínicas del grupo control	18	26
Independencia de interpretación		
Pruebas realizadas con diseño ciego	10	15
Unidad de análisis		
Reportado por número de pacientes	44	64
Reportado por tipo de espécimen respiratorio	26	36
Tipo de estándar de referencia		
PCR	10	14
Cultivo	9	13
Serología	50	73
Procedimiento de la PCR		
Método de extracción	41	59
Volumen de muestra para PCR	26	38
Concentración de MgCl ₂	29	42
Numero de ciclos	44	64
Temperatura de desnaturalización	45	65
Temperatura de alineamiento	46	67
Temperatura de la extensión	44	64
Tipo de PCR	37	53
Gen blanco	54	78
Cebadores	48	70
Control de extracción	40	58
Controles Internos	18	26
Medidas para evitar amplicones	40	58
Método de detección	53	77
Sensibilidad analítica	24	35

Evaluación de los estudios por pacientes

Figura 3. Diagrama de bosque de estimadores puntuales e intervalos de confianza al 95% de la sensibilidad y especificidad de la PCR para la detección de *M. pneumoniae* en muestras de tracto respiratorio.

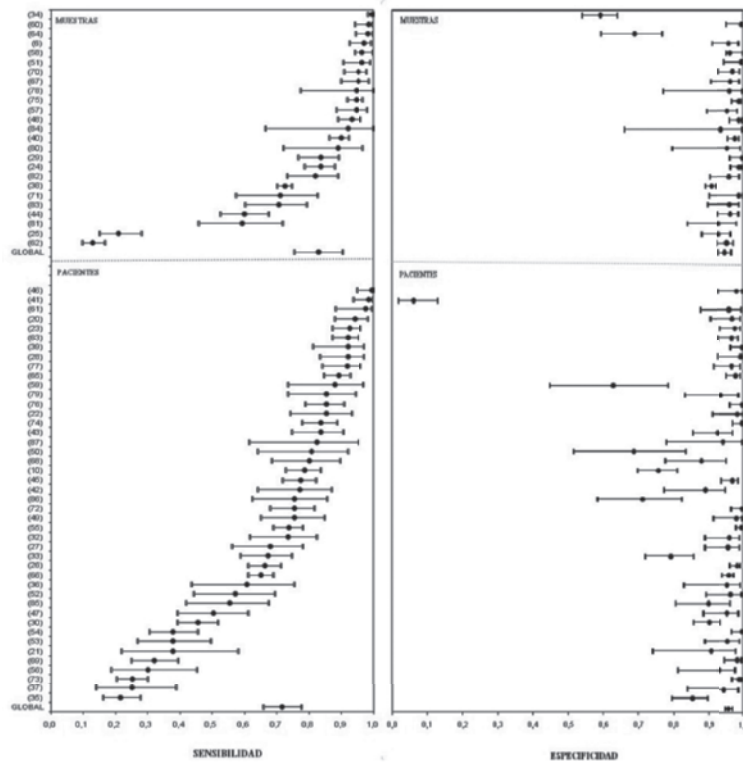
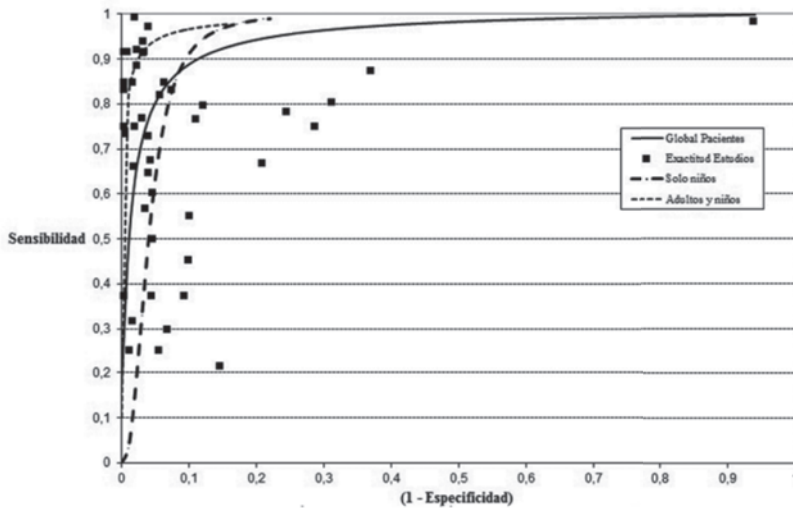


Figura 4. Summary receiver operating characteristic curves (SROC) para pacientes ajustada a año de publicación, país de realización del estudio y edad de la población en estudio. En el diagrama se representa en el eje vertical la tasa de verdaderos positivos (sensibilidad) y en el eje horizontal la tasa de falsos positivos (1-especificidad).



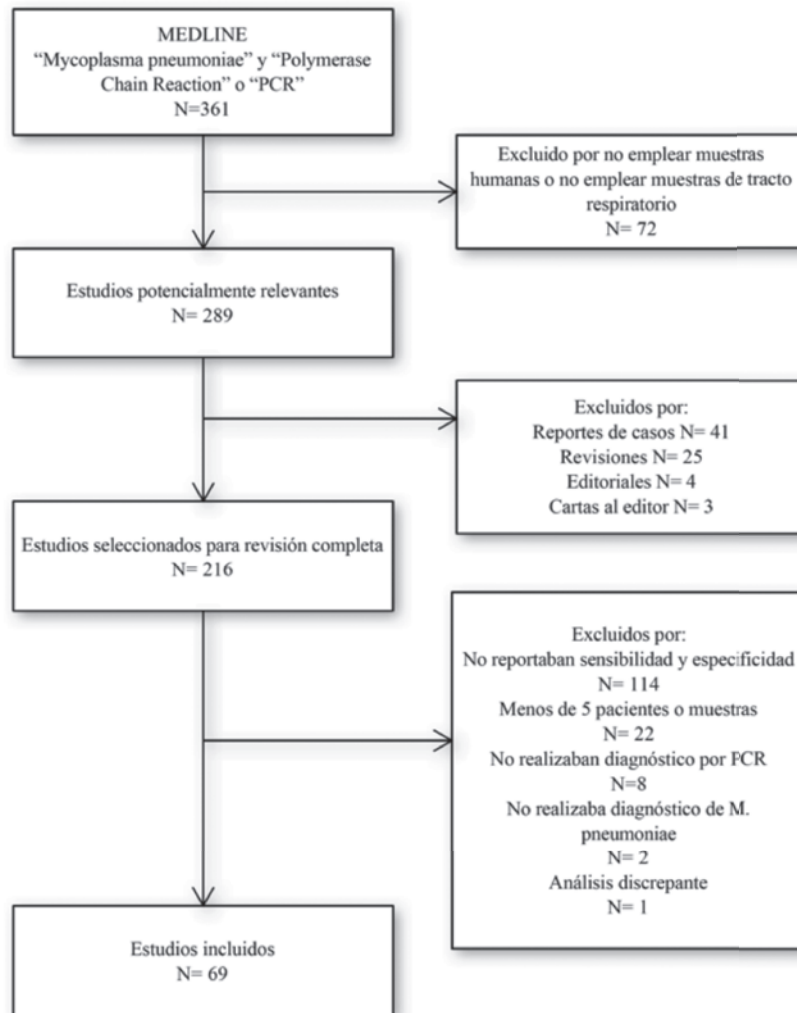


Figura 1. Diagrama de flujo de la selección e inclusión de estudios y razones de exclusión

de forma independiente los criterios de inclusión de cada estudio. Las diferencias entre los resultados de los dos autores fueron discutidas y acordadas con otro autor. Una lista de los estudios y las razones por las que fueron excluidos se encuentran disponibles por parte de los autores.

Extracción de datos y evaluación de la calidad: Dos autores realizaron la extracción de 27 variables incluidas en la revisión de los artículos

(Tabla 1). Estas variables incluyen características de publicación de los artículos, cualidades técnicas de la PCR, estándar de referencia, e información clínica y demográfica de los pacientes con infección respiratoria. No se asignó puntuación de calidad a los estudios debido a que todas las variables fueron incluidas en el modelo de meta-regresión. Dado que actualmente no hay consenso acerca del estándar de referencia para el diagnóstico de *M. pneumoniae* el estándar de referencia utilizado en la

Tabla 2. Resultados de sensibilidad, especificidad, diagnostic odds ratio (DOR) y relative diagnostic odds ratio (RDOR)

Características del estudio	Modelo de efectos aleatorios agrupados			Modelo DOR de efectos aleatorios			Modelo RDOR ajustado de efectos aleatorios ⁷		
	N ¹	SE ²	ESP ³	DOR	IC 95% ⁴	P	RDOR	IC 95% ⁵	P
Total	44	0.72	0.96	53.95	(31.38 - 92.77)	0.001	0.94	(0.69 - 1.28)	0.72
Año									
Antes de 2004	21	0.69	0.98	72.2	(36.65 - 142.38)	0.001	1.00		0.061
Después de 2004	23	0.73	0.93	39.98	(18.75 - 85.28)	0.001	0.23	(0.05 - 1.07)	
País									
Estados unidos	20	0.73	0.97	66.36	(31.50 - 139.8)	0.001	1.02	(0.26 - 3.93)	0.98
Asia. Sur América. África. Europa	24	0.7	0.94	44.87	(21.78 - 92.71)	0.001	1.00		
Tipo de muestra respiratoria									
Muestra de tracto respiratorio superior	29	0.67	0.96	48.73	(25.60 - 92.76)	0.001	1.00		
Muestra de tracto respiratorio inferior y/o superior	15	0.79	0.94	67.17	(26.25 - 171.89)	0.001	0.87	(0.38 - 1.97)	0.736
Edad									
Solo niños	23	0.65	0.96	41.05	(20.08 - 83.95)	0.001	1.00		
Niños mas adultos	16	0.83	0.96	114.4	(44.95 - 291.6)	0.001	4.81	(1.22 - 18.92)	0.022
Concentración de MgCl ₂ ⁶									
> 1.5	8	0.79	0.91	54.52	(16.30 - 182.4)	0.001	26.31	(3.39 - 204.4)	0.002
<= 1.5	5	0.65	0.9	22.85	(6.64 - 78.63)	0.023	1.00		
Número de ciclos									
< 40	12	0.74	0.97	53.11	(20.49 - 137.73)	0.001	1.00		
≥ 40	12	0.87	0.92	92.97	(33.41 - 258.74)	0.001	0,61	(0.06 - 5.99)	0.67
Tipo de primera PCR									
Convencional	28	0.71	0.98	68.3	(35.37 - 131.91)	0.001	1.31	(0.29 - 6.05)	0.72
Otro	13	0.74	0.88	41.03	(14.92 - 112.85)	0.001	1.00		
Reamplificación									
Si	19	0.76	0.97	59.51	(27.43 - 129.13)	0.001	1.64	(0.39 - 6.96)	0.67
No	17	0.7	0.93	52.87	(23.88 - 119.93)	0.001	1.00		
Tipo de Segunda PCR									
PCR Anidada	9	0.79	0.99	178.3	(62.72 - 507.02)	0.078	4.63	(0.88 - 24.9)	0.071
Otra	15	0.72	0.92	37.14	(18.33 - 75.24)	0.001	1.00		
Técnica de detección									
Hibridización	8	0.93	0.81	53.85	(11.48 - 252.56)	0.001	1.00		
Electroforesis	24	0.76	0.97	90.51	(44.81 - 182.83)	0.001	1.23	(0.08 - 8.25)	0.859
Tipo de estándar de referencia ⁷									

¹ Corresponde a número de estudios de pacientes.

² Corresponde a la sensibilidad

³ Corresponde a la especificidad

⁴ Corresponde al intervalo de confianza del 95% del *diagnostic odds ratio (DOR)*

⁵ Corresponde al intervalo de confianza del 95% del *relative diagnostic odds ratio (RDOR)*

⁶ Ajustado por año de publicación, país y edad

⁷ Ajustado por año de publicación, país, edad y estándar de referencia (serología, PCR, cultivo)

Cultivo	3	0.92	0.97	286.2	(44.67 - 1.834.01)	0.15	1.00		
Serología	37	0.68	0.95	41.66	(23.85 - 72.79)	0.001	0.16	(0.02 - 1.66)	0.125
Tipo de estándar de referencia ⁸									
Serología	37	0.68	0.95	41.66	(23.85 - 72.79)	0.001	1.00		
PCR o Cultivo	7	0.87	0.99	342.5	(81.23 - 1.444.86)	0.001	7.54	(1.16 - 49.85)	0.034
Muestra congelada (< - 70 °C)									
Si	12	0.59	0.95	31.55	(12.5 - 79)	0.001	1.12	(0,96 - 1,31)	0,16
No	10	0.75	0.91	53.21	(17.2 - 165)	0.001	1		
Tipo de serología									
ELISA	16	0.66	0.96	47.7	(18- 126.3)	0.001	1.99	(0,84 - 4,76)	0,116
> 4 veces el titulo inicial	7	0.47	0.95	14.54	(4 - 52.5)	0.001	0.03	(0,00 - 0,18)	0,001
Punto de corte arbitrario	5	0.86	0.98	202	(57.6 - 709)	0.001	1		
Aglutinación de partículas	11	0.72	0.85	22.02	(9.49 - 51.9)	0.001	0.8	(0,51 - 1,25)	0,32
> 4 veces el titulo inicial ⁹	3	0.76	0.95	63.6	(5.23 - 771)	0.001	5.1	(0.33 - 81.5)	0.25
Punto de corte arbitrario	7	0.74	0.75	18.05	(6.89 - 47.3)	0.001	1		
Fijación del complemento	5	0.76	0.98	79.17	(15.51 - 404.1)	0.001	0.32	(0,28 - 1,15)	0,142
> 4 veces el titulo inicial ¹⁰	4	0.76	0.99	113.1	(13.5 - 948.8)	0.001	2.28	(0.22 - 24.05)	0.49
Punto de corte arbitrario	1	0.76	0.89	26.93	(6.5 - 110.8)	0.001	1		
IFA	4	0.73	0.99	21.98	(21.99 - 396)	0.001	0.24	(0,04 - 1,14)	0,115
> 4 veces el titulo inicial ¹¹	2	0.63	0.98	55.3	(10.6 - 288.8)	0.001	0.07	(0.00 - 1.23)	0.069
Punto de corte arbitrario	2	0.83	0.99	339	(17.9 - 6415)	0.001	1		
Otro ¹	3	0.63	0.99	90.34	(19.45 - 419)	0.001	1.68	(0,87 - 3,22)	0,12

Efecto de las características de diseño de los estudios y el estándar de referencia. La exactitud diagnóstica de la PCR no fue diferente en estudios con diseño ciego en la metodología, comparados con los estudios que no lo realizaron (RDOR de 8,53; $p=0,796$). Tampoco se observaron diferencias en los estimadores entre el grupo de estudios prospectivos en comparación con estudios retrospectivos (RDOR de 1,07; $p=0,503$). El tipo de estándar de referencia más frecuentemente utilizado fue la serología (73%). Sin embargo, algunos de los estudios también utilizaron el cultivo o una PCR de otro tipo como estándar de referencia.

Al comparar pruebas de evidencia directa de colonización por *M. pneumoniae* (cultivo y PCR)

no se observó diferencia en la exactitud de la PCR (RDOR de 2,83; $p=0,4$). Pero al comparar los estudios que utilizaron como estándar de referencia cultivo o PCR versus serología, se evidenció mayor exactitud diagnóstica con pruebas de evidencia directa de la presencia del agente (RDOR de 7,54; $p=0,034$) (Tabla 2). Al comparar los estudios que utilizaron cultivo (prueba con menor exactitud teórica) como estándar de referencia con estudios que utilizaron serología no se observaron diferencias estadísticas en la exactitud (RDOR de 0,16; $p=0,125$). Al evaluar el efecto del tipo de serología, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ni en la sensibilidad ni en la especificidad (RDOR de 1,02; $p=0,84$). Sin embargo, al valorar el efecto del punto de corte empleado para ELISA,

⁸ Ajustado por año de publicación, país y edad

⁹ Ajustado por año de publicación y edad

¹⁰ Ajustado por año de publicación

¹¹ Sin ajuste

se encontró que un incremento de 4 o más veces en el título de anticuerpos representaba una menor exactitud de la prueba de PCR versus otro punto de corte (RDOR de 0,03; $p=0,001$) (Tabla 2). Para las demás pruebas no se encontró diferencia, sin embargo éstas carecen de ajuste como se indica en la Tabla 2.

Efecto de las características de la PCR: Estudios que utilizaron concentraciones de $MgCl_2$ superiores a 1,5mM en comparación con estudios que utilizaron concentraciones iguales o inferiores a 1,5mM, mostraron mayor exactitud (RDOR de 26,31; $p=0,002$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en exactitud diagnóstica en cuanto a las técnicas de detección de los productos de amplificación o bien mediante hibridación o sembrándolos en gel de agarosa coloreados con bromuro de etidio, ni cambiando el número de ciclos, temperatura de desnaturalización o el tipo de gen blanco.

Sesgo de publicación: La prueba de Egger demostró que los estudios incluidos en este meta-análisis tenían sesgo con tendencia a publicar estudios con sensibilidades ($p=0,034$) y especificidades altas ($p=0,009$).

Evaluación de los estudios por muestras

Sensibilidad y especificidad en estudios analizados por muestras: Entre los 25 estudios que reportaron datos en número de muestras se obtuvo una especificidad similar (94,5%) y sensibilidad mayor (82,5%) que la obtenida entre los estudios reportados por pacientes (Tabla 2). En general, el patrón de resultados por muestras no mostró diferencias al comparar con estudios que reportaron en número de pacientes (RDOR 2,33 con $p=0,172$). Sin embargo, los resultados de los estudios por número muestra no evidencian diferencias cuando se utilizan concentraciones de $MgCl_2$ superiores a

1,5mM (RDOR 0,92, $p=0,533$). La PCR convencional presentó mayor exactitud diagnóstica que los otros tipos de PCR utilizados (RDOR de 1,5 con una $p=0,01$). Además, los resultados por muestras no evidencian diferencias entre estudios con solo niños y aquellos que incluían también adultos (RDOR de 0,23; $p=0,195$), los resultados de los estudios por muestras se encuentran disponibles a través del autor principal.

DISCUSIÓN

El presente meta-análisis resume la exactitud diagnóstica de 69 estudios, que evalúan la validez de la PCR en el diagnóstico de *M. pneumoniae*. En general, la sensibilidad fue más variable y baja en comparación con la especificidad. Estudios publicados entre el 2004 a 2009, reportaron sensibilidades inferiores a estudios publicados entre 1989 y 2003. La PCR fue menos sensible en la población infantil comparada con estudios que incluían población adulta. Si bien la concentración de $MgCl_2$ debe ser optimizada dependiendo del gen blanco a amplificar, así como de los diferentes reactivos y condiciones de una prueba, este meta-análisis mostró que estudios con concentraciones de $MgCl_2$ superiores a 1,5mM mostraron mayor exactitud en comparación a aquellos donde concentraciones menores eran usadas. En cuanto al uso de antibióticos, sólo 11 estudios especificaron el uso previo de antibióticos de los cuales, sólo uno tenía pacientes con exposición previa a antibióticos (32).

La diferencia en la exactitud de la PCR en la población infantil en comparación con estudios que incluyeron adultos puede ser explicada por la dificultad de obtención de muestras óptimas para la población infantil (7). No se puede determinar si esta diferencia es independiente del tipo de muestra usada, métodos de transporte y conservación de las mismas por la falta de especificación de algunos estudios.

Así mismo, por la falta de detalle en los resultados por edad de los pacientes, el efecto en la exactitud no puede ser directamente estimada. Sin embargo, el análisis de estudios que reportaron por muestras no evidenció diferencias entre estudios con solo niños y aquellos que incluían niños y adultos; lo cual es consistente con la dificultad en la obtención de muestras, y especialmente muestras de buena calidad en niños. Las diferencias en exactitud de estudios de pacientes y estudios de muestras, se pueden explicar por incremento de la sensibilidad en razón a múltiples muestras obtenidas por cada paciente y a concentraciones variables de ácido Desoxirribonucleico o ADN en las diferentes muestras, así como a la eventual presencia de “contaminantes” como hemoglobina y diversas proteínas, que en concentraciones variables pueden afectar las pruebas moleculares (88).

Contrario a las recientes recomendaciones en cuanto al tipo de muestra respiratoria, nuestro meta-análisis no apoya la elección de un tipo de muestra en particular (7,89). En general, los estudios incluidos que emplearon muestras de tracto respiratorio inferior también utilizaron muestras de tracto respiratorio superior, y por ende, el efecto en la exactitud diagnóstica no se puede evaluar.

En cuanto a detalles técnicos de la PCR sólo la concentración de $MgCl_2$ demostró tener influencia en la exactitud diagnóstica, en la práctica es bien conocido que la concentración de este componente afecta el proceso de amplificación. Mientras en una concentración adecuada el $MgCl_2$ permite la estabilización de nucleótidos pues forma con ellos complejos solubles para producir un sustrato reconocible por la enzima Taq-polimerasa, en concentraciones no adecuadas, altas o bajas, se puede afectar la especificidad en la reacción PCR pudiendo darse lugar, por ejemplo, a la presencia de fragmentos inespecíficos (90).

Dentro de las limitaciones de nuestro meta-análisis se encuentra la búsqueda de artículos en una sola base de datos (MEDLINE), inclusión de artículos hasta junio de 2009 y restricción de artículos escritos en idioma inglés o español. De hecho, el test de Egger indica sesgo de selección de acuerdo con sensibilidad y especificidad. Aunque la sensibilidad global es relativamente pequeña, el test indica que los estudios con menor precisión y mayor sensibilidad tienen una probabilidad más alta de ser publicados. Aunque la especificidad global es alta, el test de Egger indica que estudios con mayor especificidad y menor precisión tiene una mayor probabilidad de ser publicados. Dada la heterogeneidad entre los estimadores de los diferentes estudios el test de Egger debe ser considerado a la luz de sus limitaciones(93,94).

Adicionalmente, debido a que no existe consenso en el estándar de referencia para el diagnóstico de *M. pneumoniae* en este estudio se empleó el estándar definido por cada investigador y se evaluó características del estándar de referencia que explicaran cambios en la exactitud de PCR (Tabla 2). Los estándares de referencia para evaluar el rendimiento de las técnicas de PCR en el diagnóstico de *M. pneumoniae* son imperfectos. Un estudio de población asintomática en que se compararon 8 pruebas serológicas comerciales, se demostró una baja correlación entre ellas, dado por un factor kappa inferior a 0,6 (91). Por la variabilidad de puntos de corte de la serología para considerar una prueba como positiva, no fue posible evaluar el efecto en la estimación de sensibilidad y especificidad de PCR. Sin embargo, para el tipo de prueba como la ELISA se estableció que el punto de corte es un factor de heterogeneidad.

Para demostrar infección por *M. pneumoniae* después de un resultado positivo por PCR, algunos autores han sugerido la necesidad de confirmar el resultado por otro tipo de pruebas(11). Sin embargo,

dada la alta especificidad de la PCR, un resultado positivo en pacientes con síntomas respiratorios tiene una probabilidad inferior al 0,05 de ser un falso positivo. Este resultado está posiblemente relacionado con portadores asintomáticos de *M. pneumoniae*. En contraste, se ha reportado la presencia de Inmunoglobulina M (IgM) en un 30%, aproximadamente, de población asintomática (91). La alta especificidad de la PCR permitiría disminuir el inadecuado tratamiento de pacientes sin infección y por ende la resistencia a antibióticos.

Un meta-análisis elaborado por Zahng L y colaboradores acerca del diagnóstico de *M. pneumoniae* por PCR versus serología incluyó 15 estudios publicados entre el año 2000 a 2009. (92). Aunque el presente meta-análisis a diferencia del meta-análisis de Zahng L, no realizó la búsqueda en la base de datos EMBASE, la inclusión de estudios fue más amplia y por esto la evaluación del desempeño de la PCR es más exacta. En ambos meta-análisis se evidenció mayor exactitud en estudios de adultos comparado con aquellos que incluyen población infantil. Nuestro meta-análisis no encontró diferencias en heterogeneidad debidas al tipo de PCR empleada o al tipo de gen amplificado. El meta-análisis de Zahng L y col. tiene limitaciones debido al escaso número de estudios incluidos ya que no se evaluó heterogeneidad derivada del punto de corte en las pruebas de serología (92).

Los resultados de meta-análisis son de gran utilidad para realizar análisis de sensibilidad con el fin de proveer escenarios útiles para la toma de decisiones en la práctica clínica. Específicamente con los resultados de nuestro meta-análisis realizamos un análisis de sensibilidad para evaluar la utilidad clínica de la PCR en el diagnóstico de *M. pneumoniae*. Por ejemplo, si la prevalencia en niños es igual o mayor del 40%, con base en los estimadores globales de sensibilidad (0,65) y especificidad (0,96),

el valor predictivo positivo medio de la PCR será cerca del 0,91. Por lo tanto, un resultado positivo permite suficiente certeza para iniciar tratamiento y reduce la necesidad de otras pruebas diagnósticas. Sin embargo, un resultado negativo provee menos certeza ya que el valor predictivo negativo será de 0,76. Aun en sitios con alta prevalencia, se deben valorar posibles infecciones respiratorias de etiología mixta debido a que el resultado de la PCR específica para *M. pneumoniae* no excluye la presencia de otros patógenos.

En conclusión, éste meta-análisis determinó que la PCR no puede ser recomendada aún como prueba rutinaria. Sin embargo, en poblaciones con prevalencias de infección por *M. pneumoniae* superiores a 40%, un resultado positivo por PCR permite suficiente certeza para iniciar tratamiento y reduce la necesidad de otras pruebas diagnósticas. Por la alta heterogeneidad encontrada, el presente meta-análisis no permite validar ni descartar la utilidad de la PCR en la práctica clínica. Por lo tanto la validez debe ser evaluada teniendo en cuenta las condiciones locales como la prevalencia de *M. pneumoniae*, cuadro clínico y exactitud de la técnica de PCR empleada. Futuros estudios deben reportar el espectro de la enfermedad y los resultados deben ser reportados por tipo de muestra y de acuerdo a los diferentes puntos de corte de la prueba de referencia utilizada.

Agradecimientos. A la colega Laura Patricia Camargo, por sus aportes en la recolección de datos. Esta investigación fue respaldada por la Facultad de Medicina, de la Universidad de los Andes, Bogotá – Colombia y por la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes, Bogotá - Colombia.

Conflicto de intereses: los autores del presente manuscrito declaran que no tienen conflictos de interés.

Financiación: la investigación fue financiada por la Universidad de los Andes.

REFERENCIAS

- Katz B, Waites K. Emerging intracellular bacterial infections. *Clin Lab Med* 2004 Sep;24(3):627-49, vi.
- Waites KB, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2004 Oct;17(4):697-728, table.
- Lode HM. Managing community-acquired pneumonia: a European perspective. *Respir Med* 2007 Sep;101(9):1864-73.
- Chiang WC, Teoh OH, Chong CY, Goh A, Tang JP, Chay OM. Epidemiology, clinical characteristics and antimicrobial resistance patterns of community-acquired pneumonia in 1702 hospitalized children in Singapore. *Respirology* 2007 Mar;12(2):254-61.
- Khanna M, Fan J, Pehler-Harrington K, Waters C, Douglass P, Stallock J, et al. The pneumoplex assays, a multiplex PCR-enzyme hybridization assay that allows simultaneous detection of five organisms, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia (Chlamydia)* pneumoniae, *Legionella pneumophila*, *Legionella micdadei*, and *Bordetella pertussis*, and its real-time counterpart. *J Clin Microbiol* 2005 Feb;43(2):565-71.
- Bii CC, Yamaguchi H, Kai M, Nagai K, Sugiura Y, Taguchi H, et al. *Mycoplasma pneumoniae* in children with pneumonia at Mbagathi District Hospital, Nairobi. *East Afr Med J* 2002 Jun;79(6):317-22.
- Wolf J, Daley AJ. Microbiological aspects of bacterial lower respiratory tract illness in children: atypical pathogens. *Paediatr Respir Rev* 2007 Sep;8(3):212-9, quiz.
- Martinez MA, Ruiz M, Zunino E, Luchsinger V, Avendano LF. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in adult community-acquired pneumonia by PCR and serology. *J Med Microbiol* 2008 Dec;57(Pt 12):1491-5.
- Kim NH, Lee JA, Eun BW, Shin SH, Chung EH, Park KW, et al. Comparison of polymerase chain reaction and the indirect particle agglutination antibody test for the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children during two outbreaks. *Pediatr Infect Dis J* 2007 Oct;26(10):897-903.
- Ou ZY, Zhou R, Wang FH, Lu JP, Xia JQ, Xia HM, et al. Retrospective analysis of *Mycoplasma pneumoniae* infection in pediatric fatal pneumonia in Guangzhou, South China. *Clin Pediatr (Phila)* 2008 Oct;47(8):791-6.
- Atkinson TP, Balish MF, Waites KB. Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *FEMS Microbiol Rev* 2008 Nov;32(6):956-73.
- Sanchez-Vargas FM, Gomez-Duarte OG. *Mycoplasma pneumoniae*-an emerging extra-pulmonary pathogen. *Clin Microbiol Infect* 2008 Feb;14(2):105-17.
- Vervloet LA, Marguet C, Camargos PA. Infection by *Mycoplasma pneumoniae* and its importance as an etiological agent in childhood community-acquired pneumonias. *Braz J Infect Dis* 2007 Oct;11(5):507-14.
- Daxboeck F, Krause R, Wenisch C. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Clin Microbiol Infect* 2003 Apr;9(4):263-73.
- Chan YR, Morris A. Molecular diagnostic methods in pneumonia. *Curr Opin Infect Dis* 2007 Apr;20(2):157-64.
- Miller WC. Can we do better than discrepant analysis for new diagnostic test evaluation? *Clin Infect Dis* 1998 Nov;27(5):1186-93.
- Dersimonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin Trials* 1986 Sep;7(3):177-88.
- Moses LE, Shapiro D, Littenberg B. Combining independent studies of a diagnostic test into a summary ROC curve: data-analytic approaches and some additional considerations. *Stat Med* 1993 Jul 30;12(14):1293-316.
- Egger M, Davey SG, Schneider M, Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ* 1997 Sep 13;315(7109):629-34.
- Higgins RR, Lombos E, Tang P, Rohoman K, Maki A, Brown S, et al. Verification of the ProPneumo-1 assay for the simultaneous detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in clinical respiratory specimens. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2009;8:10.
- Domenech C, Leveque N, Lina B, Najjoulah F, Floret D. Role of *Mycoplasma pneumoniae* in pediatric encephalitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009 Jan;28(1):91-4.
- El Sayed ZM, Raafat D, El Metaal AA. Relevance of serology for *Mycoplasma pneumoniae* diagnosis compared with PCR and culture in acute exacerbation of bronchial asthma. *Am J Clin Pathol* 2009 Jan;131(1):74-80.
- Nilsson AC, Bjorkman P, Persson K. Polymerase chain reaction is superior to serology for the diagnosis of acute *Mycoplasma pneumoniae* infection and reveals a high rate of persistent infection. *BMC Microbiol* 2008;8:93.
- Loens K, Beck T, Ursi D, Overdijk M, Sillekens P, Goossens H, et al. Evaluation of different nucleic acid amplification techniques for the detection of *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* and *Legionella* spp. in respiratory specimens from patients with community-acquired pneumonia. *J Microbiol Methods* 2008 Jun;73(3):257-62.
- Hohenthal U, Vainionpaa R, Meurman O, Vahtera A, Katsikalahti T, Nikoskelainen J, et al. Aetiological diagnosis of community acquired pneumonia: utility of rapid microbiological methods with respect to disease severity. *Scand J Infect Dis* 2008;40(2):131-8.
- Martinez MA, Ruiz M, Zunino E, Luchsinger V, Avendano LF. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in adult community-acquired pneumonia by PCR and serology. *J Med Microbiol* 2008 Dec;57(Pt 12):1491-5.
- Kashyap B, Kumar S, Sethi GR, Das BC, Saigal SR. Comparison of PCR, culture & serological tests for the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* in community-acquired lower respiratory tract infections in children. *Indian J Med Res* 2008 Aug;128(2):134-9.
- Otomo S, Yamamura J, Hayashi E, Nakamura T, Kakinuma H, Nakamoto Y, et al. Analysis of children with *Chlamydia (Chlamydia)* pneumoniae and *Mycoplasma pneumoniae* respiratory infections by real-time PCR assay and serological tests. *APMIS* 2008 Jun;116(6):477-83.
- van de Garde EM, Endeman H, van Hemert RN, Voom GP, Deneer VH, Leufkens HG, et al. Prior outpatient antibiotic use as predictor for microbial aetiology of community-acquired pneumonia: hospital-based study. *Eur J Clin Pharmacol* 2008 Apr;64(4):405-10.
- Huong PL, Thi NT, Nguyet NT, Van TK, Hang DT, Huong VT, et al. First report on clinical features of *Mycoplasma pneumo-*

- niae infections in Vietnamese children. *Jpn J Infect Dis* 2007 Nov;60(6):370-3.
31. Kim NH, Lee JA, Eun BW, Shin SH, Chung EH, Park KW, et al. Comparison of polymerase chain reaction and the indirect particle agglutination antibody test for the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children during two outbreaks. *Pediatr Infect Dis J* 2007 Oct;26(10):897-903.
 32. Souliou E, Almasri M, Papa A, Theodoridou A, Diza E. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infections in children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007 Jul;26(7):513-5.
 33. Liu FC, Chen PY, Huang F, Tsai CR, Lee CY, Wang LC. Rapid diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection in children by polymerase chain reaction. *J Microbiol Immunol Infect* 2007 Dec;40(6):507-12.
 34. Di ME, Cangemi G, Filippetti M, Melioli G, Biassoni R. Development and clinical validation of a real-time PCR using a uni-molecular Scorpion-based probe for the detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical isolates. *New Microbiol* 2007 Oct;30(4):415-21.
 35. Sidal M, Kilic A, Unuvar E, Oguz F, Onel M, Agacfidan A, et al. Frequency of *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* infections in children. *J Trop Pediatr* 2007 Aug;53(4):225-31.
 36. Klement E, Talkington DF, Wasserzug O, Kayouf R, Davidovitch N, Dumke R, et al. Identification of risk factors for infection in an outbreak of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract disease. *Clin Infect Dis* 2006 Nov 15;43(10):1239-45.
 37. Sohn JW, Park SC, Choi YH, Woo HJ, Cho YK, Lee JS, et al. Atypical pathogens as etiologic agents in hospitalized patients with community-acquired pneumonia in Korea: a prospective multi-center study. *J Korean Med Sci* 2006 Aug;21(4):602-7.
 38. Yamazaki T, Narita M, Sasaki N, Kenri T, Arakawa Y, Sasaki T. Comparison of PCR for sputum samples obtained by induced cough and serological tests for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection in children. *Clin Vaccine Immunol* 2006 Jun;13(6):708-10.
 39. Stralin K, Korsgaard J, Olcen P. Evaluation of a multiplex PCR for bacterial pathogens applied to bronchoalveolar lavage. *Eur Respir J* 2006 Sep;28(3):568-75.
 40. Morozumi M, Nakayama E, Iwata S, Aoki Y, Hasegawa K, Kobayashi R, et al. Simultaneous detection of pathogens in clinical samples from patients with community-acquired pneumonia by real-time PCR with pathogen-specific molecular beacon probes. *J Clin Microbiol* 2006 Apr;44(4):1440-6.
 41. Morozumi M, Ito A, Murayama SY, Hasegawa K, Kobayashi R, Iwata S, et al. Assessment of real-time PCR for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in pediatric patients. *Can J Microbiol* 2006 Feb;52(2):125-9.
 42. Bamba M, Jozaki K, Sugaya N, Tamai S, Ishihara J, Kori T, et al. Prospective surveillance for atypical pathogens in children with community-acquired pneumonia in Japan. *J Infect Chemother* 2006 Feb;12(1):36-41.
 43. Stralin K, Tornqvist E, Kaltoft MS, Olcen P, Holmberg H. Etiologic diagnosis of adult bacterial pneumonia by culture and PCR applied to respiratory tract samples. *J Clin Microbiol* 2006 Feb;44(2):643-5.
 44. Pitcher D, Chalker VJ, Sheppard C, George RC, Harrison TG. Real-time detection of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory samples with an internal processing control. *J Med Microbiol* 2006 Feb;55(Pt 2):149-55.
 45. Deerojanawong J, Prapthal N, Suwanjutha S, Lochindarat S, Chantarojanasiri T, Kunakorn M, et al. Prevalence and clinical features of *Mycoplasma pneumoniae* in Thai children. *J Med Assoc Thai* 2006 Oct;89(10):1641-7.
 46. Saito R, Misawa Y, Moriya K, Koike K, Ubukata K, Okamura N. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Med Microbiol* 2005 Nov;54(Pt 11):1037-41.
 47. Martinez TM, Pino PY, Salazar BT, Jover LE, Caroca CC, Espinoza NM, et al. [Diagnostic utility of the polymerase chain reaction for the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* in elderly patients with community-acquired pneumonia]. *Rev Chilena Infectol* 2005 Sep;22(3):251-6.
 48. Ginevra C, Barranger C, Ros A, Mory O, Stephan JL, Freymuth F, et al. Development and evaluation of Chlamyge, a new commercial test allowing simultaneous detection and identification of *Legionella*, *Chlamydia pneumoniae*, and *Mycoplasma pneumoniae* in clinical respiratory specimens by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2005 Jul;43(7):3247-54.
 49. Stralin K, Backman A, Holmberg H, Fredlund H, Olcen P. Design of a multiplex PCR for *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* to be used on sputum samples. *APMIS* 2005 Feb;113(2):99-111.
 50. Raty R, Ronkko E, Kleemola M. Sample type is crucial to the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia by PCR. *J Med Microbiol* 2005 Mar;54(Pt 3):287-91.
 51. Raggam RB, Leitner E, Berg J, Muhlbauer G, Marth E, Kessler HH. Single-run, parallel detection of DNA from three pneumonia-producing bacteria by real-time polymerase chain reaction. *J Mol Diagn* 2005 Feb;7(1):133-8.
 52. Michelow IC, Olsen K, Lozano J, Duffy LB, McCracken GH, Hardy RD. Diagnostic utility and clinical significance of naso- and oropharyngeal samples used in a PCR assay to diagnose *Mycoplasma pneumoniae* infection in children with community-acquired pneumonia. *J Clin Microbiol* 2004 Jul;42(7):3339-41.
 53. Tsolia MN, Psarras S, Bossios A, Audi H, Paldanius M, Gourgiotis D, et al. Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized school-age children: evidence for high prevalence of viral infections. *Clin Infect Dis* 2004 Sep 1;39(5):681-6.
 54. Schneeberger PM, Dorigo-Zetsma JW, van der Zee A, van BM, van Opstal JL. Diagnosis of atypical pathogens in patients hospitalized with community-acquired respiratory infection. *Scand J Infect Dis* 2004;36(4):269-73.
 55. Morozumi M, Hasegawa K, Chiba N, Iwata S, Kawamura N, Kuroki H, et al. Application of PCR for *Mycoplasma pneumoniae* detection in children with community-acquired pneumonia. *J Infect Chemother* 2004 Oct;10(5):274-9.
 56. Baer G, Engelcke G, Abele-Horn M, Schaad UB, Heininger U. Role of *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* as causative agents of community-acquired pneumonia in hospitalised children and adolescents. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003 Dec;22(12):742-5.
 57. Templeton KE, Scheltinga SA, Graffelman AW, Van Schie JM, Crielaard JW, Sillekens P, et al. Comparison and evaluation of real-time PCR, real-time nucleic acid sequence-based amplification, conventional PCR, and serology for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2003 Sep;41(9):4366-71.

58. Ursi D, Ieven M, Noordhoek GT, Ritzler M, Zandleven H, Altwegg M. An interlaboratory comparison for the detection of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory samples by the polymerase chain reaction. *J Microbiol Methods* 2003 Jun;53(3):289-94.
59. Welti M, Jatón K, Altwegg M, Sahli R, Wenger A, Bille J. Development of a multiplex real-time quantitative PCR assay to detect *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* and *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract secretions. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003 Feb;45(2):85-95.
60. Ursi D, Dirven K, Loens K, Ieven M, Goossens H. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory samples by real-time PCR using an inhibition control. *J Microbiol Methods* 2003 Oct;55(1):149-53.
61. Oguz F, Unuvar E, Aydin D, Yilmaz K, Sidal M. Frequency of *Mycoplasma pneumoniae* among atypical pneumonia of childhood. *Turk J Pediatr* 2002 Oct;44(4):283-8.
62. Haaheim H, Vorland L, Gutteberg TJ. Laboratory diagnosis of respiratory diseases: PCR versus serology. *Nucleosides Nucleotides* 2001 Apr;20(4-7):1255-8.
63. Esposito S, Blasi F, Bellini F, Allegra L, Principi N. *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* infections in children with pneumonia. Mowgli Study Group. *Eur Respir J* 2001 Feb;17(2):241-5.
 - 64) Waring AL, Halse TA, Csiza CK, Carlyn CJ, Arruda MK, Limberger RJ. Development of a genomics-based PCR assay for detection of *Mycoplasma pneumoniae* in a large outbreak in New York State. *J Clin Microbiol* 2001 Apr;39(4):1385-90.
64. Nadala D, Bossart W, Zucol F, Steiner F, Berger C, Lips U, et al. Community-acquired pneumonia in children due to *Mycoplasma pneumoniae*: diagnostic performance of a seminested 16S rDNA-PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001 Jan;39(1):15-9.
65. Principi N, Esposito S, Blasi F, Allegra L. Role of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in children with community-acquired lower respiratory tract infections. *Clin Infect Dis* 2001 May 1;32(9):1281-9.
66. Tay ST, Habsah MY, Tan SC, Rohani MY. Isolation and polymerase chain reaction detection of *Mycoplasma pneumoniae* in Malaysian patients with respiratory tract infections. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2000 Dec;31(4):688-92.
67. Honda J, Yano T, Kusaba M, Yonemitsu J, Kitajima H, Masuoka M, et al. Clinical use of capillary PCR to diagnose *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2000 Apr;38(4):1382-4.
68. Wubbel L, Muniz L, Ahmed A, Trujillo M, Carubelli C, McCoig C, et al. Etiology and treatment of community-acquired pneumonia in ambulatory children. *Pediatr Infect Dis J* 1999 Feb;18(2):98-104.
69. Corsaro D, Valassina M, Venditti D, Venard V, Le FA, Valensin PE. Multiplex PCR for rapid and differential diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in respiratory infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999 Oct;35(2):105-8.
70. Tong CY, Donnelly C, Harvey G, Sillis M. Multiplex polymerase chain reaction for the simultaneous detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, and *Chlamydia psittaci* in respiratory samples. *J Clin Pathol* 1999 Apr;52(4):257-63.
71. Dorigo-Zetsma JW, Zaat SA, Wertheim-van Dillen PM, Spanjaard L, Rijntjes J, van WG, et al. Comparison of PCR, culture, and serological tests for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infection in children. *J Clin Microbiol* 1999 Jan;37(1):14-7.
73. Saez-Llorens X, Castano E, Wubbel L, Castrejon MM, de M, I, Vallarino D, et al. [Importance of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in children with community-acquired pneumonia]. *Rev Med Panama* 1998 Sep;23(2):27-33.
74. Waris ME, Toikka P, Saarinen T, Nikkari S, Meurman O, Vainionpaa R, et al. Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children. *J Clin Microbiol* 1998 Nov;36(11):3155-9.
75. Ieven M, Ursi D, Van BH, Quint W, Niesters HG, Goossens H. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by two polymerase chain reactions and role of *M. pneumoniae* in acute respiratory tract infections in pediatric patients. *J Infect Dis* 1996 Jun;173(6):1445-52.
76. Ramirez JA, Ahkee S, Tolentino A, Miller RD, Summersgill JT. Diagnosis of *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, or *Chlamydia pneumoniae* lower respiratory infection using the polymerase chain reaction on a single throat swab specimen. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996 Jan;24(1):7-14.
77. Blackmore TK, Reznikov M, Gordon DL. Clinical utility of the polymerase chain reaction to diagnose *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Pathology* 1995 Apr;27(2):177-81.
79. Fink CG, Read SJ, Sillis M. Direct sample polymerase chain reaction for the detection of *Mycoplasma pneumoniae*: a simple system for clinical application. *Br J Biomed Sci* 1995 Mar;52(1):9-13.
80. van Kuppeveld FJ, Johansson KE, Galama JM, Kissing J, Bolske G, Hjelm E, et al. 16S rRNA based polymerase chain reaction compared with culture and serological methods for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994 May;13(5):401-5.
81. Leng Z, Kenny GE, Roberts MC. Evaluation of the detection limits of PCR for identification of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples. *Mol Cell Probes* 1994 Apr;8(2):125-30.
82. Tjhie JH, van Kuppeveld FJ, Roosendaal R, Melchers WJ, Gordijn R, MacLaren DM, et al. Direct PCR enables detection of *Mycoplasma pneumoniae* in patients with respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* 1994 Jan;32(1):11-6.
83. Luneberg E, Jensen JS, Frosch M. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by polymerase chain reaction and nonradioactive hybridization in microtiter plates. *J Clin Microbiol* 1993 May;31(5):1088-94.
84. Kai M, Kamiya S, Yabe H, Takakura I, Shiozawa K, Ozawa A. Rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples by the polymerase chain reaction. *J Med Microbiol* 1993 Mar;38(3):166-70.
85. Zigangirova NA, Popova OV, Solovjeva CV, Gintzburg AL, Prozorovsky SV. Development of a PCR-based method for diagnosing *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Lett Appl Microbiol* 1993 Feb;16(2):106-9.
86. Williamson J, Marmion BP, Worswick DA, Kok TW, Tannock G, Herd R, et al. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. 4. Antigen capture and PCR-gene amplification for detection of the *Mycoplasma*:

- problems of clinical correlation. *Epidemiol Infect* 1992 Dec;109(3):519-37.
87. Skakni L, Sardet A, Just J, Landman-Parker J, Costil J, Moniot-Ville N, et al. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples from pediatric patients by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992 Oct;30(10):2638-43.
88. Buck GE, Eid NS. Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in pediatric patients by polymerase chain reaction (PCR). *Pediatr Pulmonol* 1995 Nov;20(5):297-300.
89. Sarmiento OL, Weigle KA, Alexander J, Weber DJ, Miller WC. Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2003 Jul;41(7):3233-40.
90. te WR, W.B.Leeuwen, A.Belkum. Specific Diagnostic Tests for Atypical Respiratory Tract Pathogens. *Infect Dis Clin North Am* 2010 Mar;24(1):229-48.
- 91 Kramer MF, Coen DM. Enzymatic amplification of DNA by PCR: standard procedures and optimization. *Curr Protoc Immunol* 2001 May;Chapter 10:Unit.
- (91) Nir-Paz R, Michael-Gayego A, Ron M, Block C. Evaluation of eight commercial tests for *Mycoplasma pneumoniae* antibodies in the absence of acute infection. *Clin Microbiol Infect* 2006 Jul;12(7):685-8.
- (92) ZhangLei, Zong ZY, Liu YB, Ye H, Lv Xiao. PCR versus serology for diagnosing *Mycoplasma pneumoniae* infection: A systematic review & meta-analysis. *Indian J Med Res.* 2011 Sep; 134(3): 270–280
92. Ioannidis JP, Trikalinos TA. The appropriateness of asymmetry tests for publication bias in meta-analyses: a large survey. *CMAJ* 2007 Apr 10;176(8):1091-6.
- (94) Lau J, Ioannidis JP, Terrin N, Schmid CH, Olkin I. The case of the misleading funnel plot. *BMJ* 2006 Sep 16;333(7568):597-600.

Fecha de recibido: Agosto 5 de 2013
Fecha de aprobado: Septiembre 2 de 2013

Dirección para correspondencia:
Olga L. Sarmiento, Universidad de los Andes, Facultad de Medicina, Cra 1 No 18A-10, Edificio Q, Oficina-Q811, Bogotá, Colombia. Correo electrónico: osarmien@uniandes.edu.co