

Biología molecular en el diagnóstico de la infección respiratoria aguda de origen bacteriano

José María Marimón^{a,b}, Gustavo Cilla^a y Emilio Pérez-Trallero^{a,b,c}

^aServicio de Microbiología. Hospital Donostia. San Sebastián. Guipúzcoa. España.

^bCIBER Enfermedades Respiratorias (CIBERES). Bunyola. Mallorca. España.

^cDepartamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Medicina. Universidad del País Vasco. San Sebastián. Guipúzcoa. España.

Los métodos de diagnóstico bacteriológico empleados tradicionalmente en las infecciones respiratorias agudas (IRA) tienen limitaciones de sensibilidad (cultivo, detección directa de antígenos, etc.), o requieren un tiempo prolongado para obtener resultados (aparición de anticuerpos). En los últimos años, se han desarrollado técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN) que permiten la detección de dianas genéticas específicas de cada patógeno en muestras clínicas. Estas técnicas han mostrado ser más sensibles que el cultivo o la detección directa y, a diferencia de las serológicas, trabajan eficazmente en fase aguda. Sin embargo, tienen limitaciones, como la presencia ocasional de inhibidores de la amplificación en muestras clínicas, la persistencia de *Mycoplasma pneumoniae* o *Chlamydomphila pneumoniae* en la mucosa de algunas personas, y en la diferenciación entre infección patógena y colonización en el caso de bacterias que forman parte de la flora habitual de la vía respiratoria (*Streptococcus pneumoniae*, etc.). Las recientemente desarrolladas TAAN en tiempo real han generado expectativas de resolver algunos de estos problemas, al poder cuantificar la carga bacteriana. En el diagnóstico etiológico de la IRA debida a *S. pneumoniae*, las TAAN siguen estando esencialmente en el campo de la investigación. En el caso de *M. pneumoniae* y *C. pneumoniae*, su combinación con la serología mejora la capacidad diagnóstica. Estos métodos son sensibles y específicos para detectar *Legionella*; sin embargo, su utilidad práctica está por establecer, a la espera de una valoración en relación con la antigenuria. Actualmente, son una alternativa ventajosa para *Bordetella pertussis*, pero de momento no tienen utilidad en la infección aguda por *Coxiella burnetii*.

Palabras clave: Reacción en cadena de la polimerasa. *Streptococcus pneumoniae*. *Mycoplasma pneumoniae*. *Chlamydomphila pneumoniae*. *Legionella pneumophila*. *Bordetella pertussis*.

Molecular biology in the diagnosis of acute bacterial infection of the respiratory tract

The bacteriological methods traditionally used in the diagnosis of acute respiratory infections (ARI) have limited sensitivity (culture, direct antigen detection, etc.) or require long periods to obtain results (appearance of antibodies). In the last few years, nucleic acid amplification techniques (NAAT) have been developed that allow pathogen-specific genetic targets to be detected in clinical samples. These techniques have been proven to be more sensitive than culture or direct detection and, unlike serological tests, are effective in the acute phase of the infection. However, NAAT also have certain limitations, such as the occasional presence of amplification inhibitors in clinical samples, the persistence of *Mycoplasma pneumoniae* or *Chlamydomphila pneumoniae* in the mucosa of some individuals, and the lack of discrimination between pathogen infection and colonization in bacteria forming part of normal respiratory tract flora (*Streptococcus pneumoniae*...). Recently developed real-time NAAT have raised expectations that some of these obstacles will be resolved, since these techniques allow bacterial load to be quantified. In the etiological diagnosis of ARI due to *S. pneumoniae*, the use of NAAT is still in an experimental phase. In *M. pneumoniae* and *C. pneumoniae*, combining NAAT with serological tests could potentially improve diagnosis. NAAT show good sensitivity and specificity in the detection of *Legionella*; however, the practical utility of these techniques should be weighed against that of antigenuria. NAAT provide advantages over other techniques in *Bordetella pertussis*. At present, these techniques are not useful in the diagnosis of *Coxiella burnetii* acute infections.

Key words: Polymerase chain reaction. *Streptococcus pneumoniae*. *Mycoplasma pneumoniae*. *Chlamydomphila pneumoniae*. *Legionella pneumophila*. *Bordetella pertussis*.

Correspondencia: Dr. J.M. Marimón Ortiz de Zárate.
Servicio de Microbiología. Hospital Donostia.
P.º Dr. Beguiristain, s/n. 20014 San Sebastián. Guipúzcoa. España.
Correo electrónico: josemaria.marimonortizdez@osakidetza.net

Introducción

La infección respiratoria aguda (IRA) puede dividirse según su localización en: infección de vías respiratorias altas e infección de vías respiratorias bajas. Entre las IRA de vías bajas, la neumonía adquirida en la comunidad (NAC) es la gran protagonista, ya que es la primera causa de muerte por enfermedad infecciosa en todo el mundo. *Streptococcus pneumoniae* es el principal causante de NAC, tanto por el número elevado de casos que origina, como por su gravedad¹. Además, esta bacteria es la causa más importante de neumonía en pacientes que requieren hospitalización y la que ocasiona la mayoría de las muertes¹⁻³. Se cree también que la mayor parte de las NAC del adulto de etiología no definida son neumocócicas⁴. *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* y *Legionella pneumophila* también son causas importantes de NAC^{5,6}, siendo *Legionella* la que con más frecuencia ocasiona cuadros graves. Las bacterias del género *Haemophilus* o *Moraxella* causan enfermedad especialmente en pacientes con enfermedad pulmonar crónica². En algunas áreas del norte de España, *Coxiella burnetii* ocasiona un número elevado de casos de NAC⁷. Un papel importante para los virus como agentes etiológicos de IRA y NAC está siendo revelado gracias a las mejoras diagnósticas de los últimos años⁸.

El diagnóstico etiológico tiene importancia no sólo por sus implicaciones terapéuticas, sino también por la información epidemiológica que aporta, esencial para el diseño adecuado de medidas preventivas. Sin embargo, los métodos diagnósticos convencionales tienen limitaciones. El cultivo de muestras respiratorias (generalmente esputo o BAL) es poco sensible y a veces difícil de interpretar. La detección de antígenos en orina, un gran paso en el diagnóstico de la neumonía neumocócica y la legionelosis, tiene sensibilidad subóptima y es inespecífica para la investigación de la etiología neumocócica en niños pequeños. El hemocultivo es poco sensible, igual que la serología en fase aguda, por lo que su utilidad clínica es limitada. Por tanto, hay una "brecha diagnóstica", dado que en un porcentaje elevado de los casos de NAC no se alcanza el diagnóstico etiológico.

En los últimos años se han desarrollado técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN) para detectar patógenos respiratorios, algunas de las cuales se están comercializando. El presente trabajo revisa el papel en el diagnóstico etiológico de la NAC de las técnicas moleculares que permiten detectar los patógenos respiratorios bacterianos más relevantes. Con la excepción de *Legionella* y *Coxiella*, los mismos patógenos están implicados en la IRA de otras localizaciones (bronquitis, otitis, sinusitis, exacerbaciones de enfermedad pulmonar obstructiva crónica, etc.), si bien el empleo de TAAN en el diagnóstico de estas entidades no se considera actualmente, salvo desde el punto de vista de la investigación. Una excepción importante es la tos ferina, enfermedad de gran importancia para la salud pública en el ámbito mundial y difícil de diagnosticar con los métodos convencionales, para la que se ha acumulado ya una amplia experiencia con métodos moleculares, motivo por el que también se ha incluido en esta revisión.

Streptococcus pneumoniae

El diagnóstico de la infección respiratoria neumocócica plantea problemas importantes. Entre ellos destacan la falta de sensibilidad de las técnicas de detección convencionales y el hecho de que además de patógeno primario, el neumococo es un colonizante habitual de la vía respiratoria, lo que dificulta la interpretación de los hallazgos microbiológicos. Aunque la detección de antígeno en orina ha aumentado la capacidad diagnóstica en el adulto, no es útil en niños pequeños. Las TAAN abren nuevas posibilidades diagnósticas que revisaremos en este apartado.

El genoma de *S. pneumoniae* está compuesto de unos 2.260 genes albergados en poco más de 2160 kb. Las dianas más empleadas para detectarlo están en los genes de la neumolisina (gen *ply*), de la autolisina (gen *lytA*), de la adhesina neumocócica superficial (gen *psaA*), de las proteínas de unión de la penicilina (gen *pbp2b*) y en el gen *Spn9802*⁹⁻¹⁴. El gen de la neumolisina ha sido el más utilizado hasta ahora para detectar el neumococo en estudios clínicos, pero está presente en estreptococos del grupo *viridans* y en la nueva especie *S. pseudopneumoniae*¹¹. Por ello, su valor como diana para el diagnóstico ha sido cuestionado¹⁴. El gen de la autolisina, también muy usado para detectar *S. pneumoniae*, y el gen *psaA* son más específicos, aunque se ha descrito su presencia en algunos aislamientos de *S. pseudopneumoniae*, al igual que la del gen *Spn9802*^{10,14}. Hasta conocer la prevalencia de *S. pseudopneumoniae* como comensal, no se sabrá la trascendencia de esta falta de especificidad, si bien se supone escasa.

Utilizando estas dianas, se han desarrollado diferentes TAAN (p. ej., la reacción en cadena de la polimerasa [PCR]), para detectar ácido desoxirribonucleico (ADN) de neumococo: desde la PCR convencional⁹, la PCR anidada¹² o la PCR multiplex para la detección conjunta con otros patógenos, a la más reciente PCR en tiempo real (RT-PCR, en sus siglas en inglés). La RT-PCR aporta la posibilidad de cuantificar la carga bacteriana junto a una mayor rapidez, fiabilidad (menor riesgo de contaminaciones) y sensibilidad (detección de menos de 10 copias de los genes *ply* o *lytA*)¹¹. Su uso en muestras estériles es relativamente sencillo, ya que la simple detección de ADN del patógeno es diagnóstica. Los métodos moleculares han obtenido excelentes resultados para detectar *S. pneumoniae* en derrame pleural o líquido cefalorraquídeo (LCR). En pacientes con sospecha de meningitis, se han descrito métodos muy sensibles que no sólo detectan ADN del patógeno en pocas horas, sino que pueden determinar su susceptibilidad a penicilina amplificando regiones conservadas del gen de la *pbp2b*¹³. Los resultados obtenidos en sangre de individuos con NAC son, por el momento, menos alentadores¹¹, debido fundamentalmente a la baja frecuencia y el breve período en que la NAC es bacteriémica. No obstante, el verdadero reto de la biología molecular es la detección diagnóstica de ADN de *S. pneumoniae* en mucosa respiratoria, lo que implica mejoras en la especificidad de las dianas y/o una adecuada valoración de la carga bacteriana. Estudios iniciales en la cuantificación de la carga bacteriana neumocócica en secreción bronquial han indicado que $\geq 10^4$ copias de ADN/ml para el gen *Spn9802*¹⁴ o $3,7 \times 10^4 - 10^5$ copias ADN/ml para el gen *ply*^{15,16} tienen valor para el

diagnóstico de infección del tracto respiratorio inferior. Otros problemas menores atañen a la calidad del esputo y la posible presencia de inhibidores de la amplificación.

En conclusión, en el diagnóstico de las infecciones neumocócicas, los métodos moleculares siguen estando esencialmente en el campo de la investigación. Su valoración es difícil por falta de un método de referencia diagnóstico. Los mejores resultados se han obtenido en muestras estériles (LCR, líquido pleural y, menos satisfactoriamente, sangre) y de momento éste es el objetivo de los escasos nuevos métodos recién comercializados o a punto de serlo. Finalmente, aunque los resultados preliminares indican que la RT-PCR tiene potencial para diferenciar entre colonización e infección neumocócica en muestras respiratorias, faltan estudios para establecer su verdadera utilidad clínica.

Mycoplasma pneumoniae, *Chlamydomydia pneumoniae* y *Coxiella burnetii*

Las infecciones causadas por *M. pneumoniae* y *C. pneumoniae* tienen numerosas similitudes. Ambos agentes son una causa importante de IRA, tanto de vías altas (faringitis, etc.) como bajas (bronquitis, neumonía). *M. pneumoniae* se ha considerado en numerosos estudios la segunda causa de NAC, y se ha detectado en un 10-20% (hasta 40%) de los casos. Por otra parte, en un 3-15% de los pacientes con NAC se ha encontrado infección por *C. pneumoniae*. En ambos casos, los niños en edad escolar y adultos jóvenes fueron los grupos más afectados^{5,6}. La mayor parte de las neumonías son leves y los pacientes suelen ser tratados en el ámbito extrahospitalario, pero su elevada incidencia explica que sean también causa de hospitalización, especialmente en niños, ancianos o personas con enfermedades subyacentes. Asimismo, se piensa que ambas bacterias pueden tener un papel en el desarrollo y/o la exacerbación de enfermedades pulmonares crónicas como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o el asma^{5,6}. *C. burnetii* produce cuadros febriles, a menudo con pocas manifestaciones clínicas. Sin embargo, es causa de neumonía, siendo ésta la forma clínica de la infección más frecuentemente reconocida en determinadas zonas geográficas⁷.

Aunque *M. pneumoniae* se considera agente patógeno y no comensal, se sabe que hay infecciones asintomáticas y que, tras una infección, la bacteria tarda en algunos casos semanas o incluso meses en ser eliminada de la vía respiratoria. La infección se puede adquirir varias veces a lo largo de la vida, lo que depende de variaciones en las proteínas de la superficie bacteriana. La principal es la proteína P1, que es inmunodominante, facilita la adhesión a la mucosa respiratoria y permite diferenciar 2 subtipos en *M. pneumoniae*⁵. A pesar de su potencial patógeno, la mayor parte de las infecciones causadas por *C. pneumoniae* son asintomáticas o de sintomatología inespecífica. En nuestro medio, las primoinfecciones tienen lugar normalmente antes de la edad adulta¹⁷. También en este caso la infección puede adquirirse más de una vez en la vida. Se ha observado portación asintomática en nasofaringe (1-6% de los niños y adultos), pero la infección persistente es rara¹⁸. En contra de la creencia inicial, *C. pneumoniae* no es un patógeno exclusivamente humano, dado que se ha aislado de diferentes especies animales¹⁹.

Genomas

Dianas de los métodos de amplificación

M. pneumoniae (cromosoma de 816 kb) y *C. pneumoniae* (cromosoma de 1.226 kb) están entre las bacterias con genoma de menor tamaño conocido (4-6 veces menor que el de *Escherichia coli*). Ambas han experimentado un proceso de evolución degenerativa durante millones de años, que les ha llevado a perder numerosos genes, lo que explica su limitada capacidad de biosíntesis (ambas son parásitos obligados, *C. pneumoniae* intracelular) y la incapacidad de *M. pneumoniae* para sintetizar la pared bacteriana⁵. En el caso de *C. pneumoniae*, debido a lo aislado de su nicho ecológico intracelular, parece que los intercambios horizontales de material genético son raros, siendo las mutaciones puntuales su principal fuente de variación molecular²⁰. Los estudios moleculares demuestran un genoma muy conservado con una población altamente clonal. De hecho, la similitud genética entre las cepas humanas de *C. pneumoniae* aisladas en el mundo es > 99%. El genoma de *C. burnetii* es de mayor tamaño (~2.000 kb), alberga plásmidos y hay varios grupos genómicos.

Las dianas más usadas en las TAAN para *M. pneumoniae* están en los genes de la ATPasa, proteína P1, y regiones conservadas del gen del ácido ribonucleico (ARN) ribosomal de 16S (16S ARNr) (tabla 1). Más recientemente, se han descrito métodos basados en los denominados elementos *rep*, secuencias repetidas 8-14 veces a lo largo del genoma. El uso como dianas de estos elementos puede aumentar la sensibilidad de las TAAN para *M. pneumoniae* y permite el subtipado directamente de muestra clínica. En los genes de la ATPasa y 16S ARNr no hay elementos *rep*. Por el contrario, en el gen *P1* intervienen elementos *rep* y regiones no repetidas, por lo que, aun dirigidas a un mismo gen, la sensibilidad de las TAAN podría ser diferente. Para *C. pneumoniae*, se han empleado como dianas varias regiones del genoma, pero las TAAN más usadas emplean los genes *OmpA*, *16S ARNr* y *PstI*²¹. El empleo de regiones muy conservadas del genoma permite la detección, no discriminante de especie, de bacterias de la familia *Chlamydiaceae* y, por tanto, de *Chlamydia trachomatis* y también *Chlamydomydia psittaci*. Para detectar *C. burnetii*, se han empleado dianas de diferentes genes procedentes de ARNr, plásmidos y, sobre todo, la secuencia de inserción IS1111, repetida varias veces a lo largo del genoma.

Comportamiento de los métodos de amplificación

La mayor parte de los métodos de amplificación desarrollados para *M. pneumoniae* y *C. pneumoniae* son sensibles y específicos. La variedad de métodos descrita es grande^{5,22}, pero los estudios comparativos entre ellos son escasos y no permiten establecer diferencias definitivas. Se ha señalado que los métodos de PCR anidada, por la mayor posibilidad de contaminación, tienen un peligro especial de generar resultados falsos positivos²². Para los métodos moleculares, se pueden emplear diversos tipos de muestras respiratorias con buen resultado (frotis faríngeo, lavado nasofaríngeo, esputo, etc.). Aunque se ha referido el esputo como muy sensible, probablemente por su mayor carga bacteriana²³, no siempre es fácil de obtener, dado que en la neumonía atípica la tos es con frecuencia improductiva. La existencia de inhibidores de la

TABLA 1. Algunos métodos moleculares comercialmente disponibles en España para detectar en muestras respiratorias bacterias causantes de infecciones respiratorias agudas de vías bajas (poseen marcado de la Comunidad Europea y control interno)

Fabricante	Agentes que pueden investigarse	Dianas (genes) para la amplificación	Método	Muestras recomendadas
Argene	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Legionella</i> spp. <i>Legionella pneumophila</i> <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	<i>P1</i> ARNr región intergénica 5S-23S <i>Omp2</i>	PCR convencional + tipado por hibridación	Varias ^d
Autoimmun Diagnostika GmbH (AID)	Detección simultánea de ADN de 8 bacterias ^b	Ver ^b	PCR convencional multiplex + hibridación inversa	Varias ^d
Becton Dickinson	<i>M. pneumoniae</i> <i>L. pneumophila</i> <i>Chlamydiaceae</i> ^c	<i>P1</i> <i>mip</i> ARNasa P	SDA en tiempo real	Frotis faríngeo
bioMérieux ^a	<i>M. pneumoniae</i> <i>C. pneumoniae</i> <i>Legionella</i> spp.	16S ARNr 16S ARNr 16S ARNr	NASBA en tiempo real	Esputo y LBA
Euroclone	<i>M. pneumoniae</i> <i>L. pneumophila</i> <i>Legionella</i> spp. <i>C. pneumoniae</i>	<i>P1</i> 23S ARNr 16S ARNr <i>OmpA</i>	PCR en tiempo real	Varias ^d
Geneproof	<i>C. pneumoniae</i>	16S ARNr	PCR convencional	Varias ^d
Minerva Biolabs	<i>M. pneumoniae</i> <i>Legionella</i> spp. <i>L. pneumophila</i>	<i>P1</i> 16S ARNr <i>mip</i>	PCR convencional y PCR en tiempo real	Varias ^d
Nanogen Inc	<i>M. pneumoniae</i> <i>C. pneumoniae</i> <i>L. pneumophila</i>	<i>P1</i> <i>OmpA</i> <i>mip</i>	PCR en tiempo real o PCR convencional simultánea	Varias ^d
NovaTec Immundiagnostica GmbH	<i>M. pneumoniae</i> <i>L. pneumophila</i>	16S ARNr 16S ARNr	PCR en tiempo real	Esputo y frotis faríngeo Esputo y frotis oral
Prodesse	<i>M. pneumoniae</i> <i>C. pneumoniae</i> <i>B. pertussis</i>	16-23S ARNr <i>OmpA</i> <i>IS481</i>	PCR en tiempo real multiplex	Varias ^d Muestras nasofaríngeas
Vircell ^a	<i>M. pneumoniae</i> <i>L. pneumophila</i> <i>C. pneumoniae</i>	<i>P1</i> <i>mip</i> <i>OmpA</i>	PCR convencional + oligocromatografía	Varias ^d

ARN: ácido ribonucleico; NASBA: amplificación isotérmica de ARN; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; SDA: amplificación por desplazamiento de cadena.

^aComercialización anunciada por la casa fabricante para 2008.

^b*Mycoplasma pneumoniae* (*ATPase*), *Chlamydomphila pneumoniae* (*ompA*), *Legionella pneumophila* (*mip*), *Streptococcus pneumoniae* (neumolisina), *Moraxella catarrhalis* (*ompG1b*), *Haemophilus influenzae* (*bexA*), *Bordetella pertussis* (*IS481*) y *Bordetella parapertussis* (*IS1001*).

^cDetección a nivel de familia, incluidos *Chlamydomphila pneumoniae*, *Chlamydomphila psittaci* y *Chlamydia trachomatis*.

^dMuestras respiratorias varias (frotis faríngeo, aspirado nasofaríngeo, esputo, lavado broncoalvelolar, etc.).

amplificación en algunas muestras respiratorias puede ocasionar resultados falsamente negativos. Sin embargo, la introducción de controles internos permite detectar esta situación. Debido a las infecciones asintomáticas y la persistencia ocasional de estos agentes en la vía respiratoria, los resultados positivos permiten considerar estas bacterias causa "probable" de la infección²⁴. Se espera que la cuantificación de la carga bacteriana, gracias a los métodos de amplificación en tiempo real, permita en un futuro diferenciar persistencia o colonización de infección patógena.

Los métodos de amplificación son la mejor alternativa para demostrar la presencia de *M. pneumoniae* en la vía respiratoria, siendo más sensibles que el cultivo, la hibridación molecular o la detección de antígeno. Permiten obtener resultados en pocas horas, a partir de muestras contaminadas, y no requieren la existencia de bacterias viables, un problema para el cultivo debido a la labilidad

de *M. pneumoniae* por la ausencia de pared bacteriana. En las muestras respiratorias, la detección de *C. pneumoniae* mediante TAAN es al menos tan sensible como el cultivo y más fácil de introducir en los laboratorios clínicos. Sin embargo, la experiencia existente es menor que en el caso de *M. pneumoniae*, debido a las limitaciones de las técnicas convencionales, que han dificultado la realización de estudios comparativos.

En conclusión, la principal ventaja de los métodos de amplificación es que permiten demostrar la presencia de *M. pneumoniae* y *C. pneumoniae* en fase aguda, cuando la respuesta serológica es subóptima, en pacientes de cualquier edad y condición (niños, ancianos, inmunodeprimidos, etc.) con primoinfección o con reinfección. En la actualidad, el diagnóstico óptimo de las infecciones por *M. pneumoniae* o por *C. pneumoniae* aconseja el empleo de TAAN además de los métodos serológicos, los cuales permiten la confirmación etiológica, si bien frecuente-

mente de modo retrospectivo. Debido a su elevado coste económico, el empleo de métodos moleculares debe quedar limitado en la actualidad a pacientes con cuadros graves (p. ej., hospitalizados con NAC). Por el momento, no se han desarrollado métodos moleculares de rendimiento satisfactorio para detectar *C. burnetii* durante la infección aguda, y la serología permanece como el método diagnóstico de elección.

Legionella pneumophila

Entre las NAC no neumocócicas, las causadas por *L. pneumophila* son las que con más frecuencia tienen un desenlace fatal. Describas como neumonías atípicas, sus manifestaciones clínicas son frecuentemente indistinguibles de las ocasionadas por otros microorganismos, lo que aconseja su diagnóstico para facilitar un tratamiento antibiótico adecuado²⁵. Se estima que el 1-5% de las NAC están causadas por este agente, aunque la incidencia puede variar en función del área geográfica y la estación del año^{4,25}. Si bien en brotes comunitarios la mortalidad raramente es superior al 3%, la documentada en brotes hospitalarios es especialmente grave, ya que con frecuencia supera el 10%. Se han identificado 48 especies de *Legionella*, siendo *L. pneumophila* el agente causal del 85-90% de las neumonías causadas por *Legionella* spp. Otras especies como *L. longbeachae*, *L. bozemanii*, etc. también causan enfermedad²⁶. De los 15 serogrupos de *L. pneumophila* conocidos, el serogrupo 1 es la causa de más del 80% de los casos que esta especie provoca²⁷.

Para el diagnóstico de la legionelosis se dispone de diferentes métodos, entre los que destacan el cultivo, la detección de antígeno urinario y las TAAN²⁵. El cultivo permite recuperar todas las especies; sin embargo, su sensibilidad es relativamente baja (20-60%)²⁸. La detección de antígeno urinario es una técnica rápida, muy específica y bastante sensible para diagnosticar las infecciones por *L. pneumophila* del serogrupo 1 (70-80%), aunque tiene el inconveniente de que su utilidad para el diagnóstico de *L. pneumophila* de otros serogrupos o de legionelas de otras especies es muy limitada^{25,29}. En los últimos años han surgido diferentes TAAN (PCR, amplificación isotérmica de ARN, amplificación por desplazamiento de cadena, etc.). A priori, son una herramienta atractiva para el diagnóstico de la neumonía por *Legionella*, ya que son muy sensibles, pueden detectar todas las especies y serogrupos de *Legionella* y ofrecen resultados en pocas horas. Además, *Legionella* spp. no forma parte de la flora humana habitual, lo que facilita la interpretación de resultados. La mayoría de las TAAN emplean como diana los genes codificantes del 5S y 16S ARNr^{30,31}, de la región intergénica ARNr 5S-23S³² o del gen *mip*, codificante del factor potenciador de la infectividad del macrófago³³.

Mediante el gen 16S ARNr se puede detectar cualquier especie de *Legionella* (como grupo), mientras que con el gen *mip* se puede detectar específicamente *L. pneumophila*³³. A partir de estos genes se han desarrollado métodos moleculares, la mayoría de amplificación en tiempo real, que permiten detectar simultáneamente la presencia de cualquier *Legionella* (sin diferenciarlas entre ellas) y específicamente la de *L. pneumophila*, a partir de sondas de hibridación para su detección³⁰. Las muestras pre-

feribles para el diagnóstico molecular de la legionelosis son las respiratorias, especialmente esputos y lavados o aspirados bronquiales^{29,31,33}. Tratando de superar el problema que plantea la falta de producción de esputo en muchos pacientes con legionelosis^{25,34,35}, se han realizado estudios para detectar ADN de *Legionella* en orina³⁶ y sangre o suero^{34,35}, y se han obtenido resultados prometedores, sobre todo en las 2 últimas. La detección del ADN de *Legionella* en sangre es máxima entre los 6 y 10 días de la aparición de los síntomas, lo que corresponde con el pico de detección de antígeno en orina³⁴ y permanece detectable por más tiempo que éste. Un problema potencial que debe tenerse en cuenta en los métodos moleculares diseñados para detectar *Legionella* spp. es la posible contaminación de reactivos, principalmente de extracción, con ADN de *Legionella* spp., causante de resultados falsamente positivos, lo que nos vuelve a recordar la imperiosa necesidad de ser estrictos en los protocolos de asealamiento de la calidad^{25,37}.

En conclusión, los métodos moleculares utilizados para el diagnóstico de la legionelosis han demostrado una elevada sensibilidad y especificidad. Aun así, el valor del diagnóstico de legionelosis mediante TAAN todavía tiene que establecerse, lo que cobra más importancia si cabe dado que numerosas técnicas moleculares para detectar *Legionella* spp. o *L. pneumophila* se están comercializando (tabla 1). En especial, será importante estudiar qué aportan las TAAN en relación con el antígeno urinario. El Grupo de Trabajo Europeo para la infección por *Legionella* sigue considerando a día de hoy la detección de ADN de *Legionella* spp. en muestras clínicas como "diagnóstico de sospecha" de legionelosis³⁸.

Bordetella pertussis

Bordetella pertussis es el agente causal de la tos ferina, que en población no vacunada afecta principalmente a menores de 5 años de edad. *B. parapertussis* causa un cuadro similar, aunque más raro y generalmente menos grave. Otras especies, como *B. bronchiseptica* y *B. holmselii*, se han implicado muy raramente con la enfermedad pertusoides. El diagnóstico convencional de la tos ferina se basa en el cultivo bacteriológico y en técnicas inmunológicas. Aunque el aislamiento de *B. pertussis* en secreciones nasofaríngeas tiene una especificidad cercana al 100% (no forma parte de la flora habitual), su sensibilidad es baja y el crecimiento, lento, por lo que es necesario emplear medios de cultivo específicos. Por otro lado, las técnicas de detección directa (p. ej., IFD) en secreciones nasofaríngeas y las serológicas pueden tener especificidad baja, y la aparición de anticuerpos detectables en ocasiones lleva semanas. En esta situación, los nuevos métodos moleculares se perfilan como una alternativa atractiva para detectar *Bordetella* en muestras clínicas.

El genoma de *B. pertussis* contiene unos 4.100 kb que codifican alrededor de 3.816 genes. Como dianas para detectar el ADN de *B. pertussis* se han empleado al menos 5 genes diferentes: secuencias de inserción (IS) que se repiten a lo largo del genoma, la región promotora de la toxina pertúsica, el gen de la adenilato ciclasa, el gen de la porina y el gen de la pertactina, proteína de membrana considerada un importante factor de virulencia en *B. per-*

tussis^{39,42}. Hasta el momento, la diana que con más frecuencia se ha empleado es el fragmento de inserción IS481, presente en su genoma entre 80 y 100 veces, lo que aumenta la sensibilidad de las TAAN⁴⁰. El fragmento IS481, aunque en menor número de copias, se ha encontrado en otras especies de *Bordetella*, como *B. holmesii*⁴², y en el 5% de las cepas de *B. bronchiseptica*⁴³. En esta situación, algunos autores han indicado el uso de una segunda PCR dirigida a otra diana en los casos en que la PCR frente a IS481 sea positiva³⁹. Para detectar *B. parapertussis*, la diana más utilizada es el fragmento de inserción IS1001, repetido unas 20 veces en el genoma de la bacteria, que también detecta *B. holmesii*, pero no *B. pertussis*. Por tanto, una combinación de las dianas IS481 y IS1001 permite detectar y diferenciar *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. holmesii*⁴². Otra diana usada con frecuencia para detectar *B. pertussis*, y que posibilita la detección específica de esta especie, es la región promotora de la toxina pertúsica⁴¹. En los últimos años, se han desarrollado numerosas TAAN (principalmente PCR) para detectar *Bordetella*. Inicialmente, se utilizó la PCR convencional, con cebadores frente a la IS481^{42,43}. Más adelante se empezó a utilizar la RT-PCR, empleando distintos tipos de dianas y sondas^{42,44,45} para detectar el ADN amplificado. Según la diana utilizada, las sensibilidad analítica de la PCR para *B. pertussis* puede ser tan baja como 0,1-1 UFC/ml de muestra o por reacción de PCR^{39,42,44}.

Las muestras más utilizadas para el diagnóstico de la tos ferina mediante PCR son los aspirados y exudados nasofaríngeos⁴⁵, aunque se han utilizado otras, como frotis nasal o faríngeo y esputo^{42,45}. En todos los estudios, la sensibilidad de la PCR ha sido claramente superior a la del cultivo. Sin embargo, uno de los problemas que han enfrentado estos estudios es la evaluación de la sensibilidad y la especificidad de la PCR, debido a que el cultivo (técnica de referencia) es poco sensible para detectar *B. pertussis*^{44,45}. Cuando los criterios de valoración de la PCR se basan en la evaluación clínica de los pacientes, su sensibilidad y especificidad superan el 90%^{42,44}. El mejor comportamiento de la PCR se debe a que el cultivo necesita microorganismos viables, siendo *B. pertussis* un organismo especialmente lábil. Además, así como el tipo de muestra afecta al rendimiento del cultivo, no parece suceder lo mismo con la PCR (rendimiento similar con esputo, aspirado nasofaríngeo, hisopo nasal o faríngeo)⁴². Debido a su elevada sensibilidad, la PCR es también útil en los estadios finales de la tos ferina, en adultos, en pacientes que han sido anteriormente vacunados y en pacientes en tratamiento antibiótico específico, situaciones en las que la carga bacteriana es muy baja y el rendimiento del cultivo, prácticamente nulo.

Los métodos moleculares están llamados a tener un papel destacado en el diagnóstico de la tos ferina. Su utilización ayudará a potenciar la capacidad diagnóstica de los laboratorios de microbiología, con ocasión de casos y brotes de esta enfermedad.

Conclusión

Los métodos moleculares para detectar bacterias relevantes en las IRA son más sensibles y más rápidos en ob-

tener resultados que los métodos diagnósticos tradicionales, y, en general, de buena especificidad. Por ello, estos métodos tienen un potencial importante para reducir la "brecha diagnóstica" existente en la actualidad y colaborar en la orientación terapéutica. El principal problema que plantean es el de la interpretación de resultados positivos en muestras tomadas de mucosa en el caso de bacterias que ocasionalmente, y de modo transitorio, pueden colonizarla (*M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*), y especialmente en el caso de las que forman parte de su flora habitual (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*). Por otra parte, el empleo de métodos más sensibles y un panel cada vez más amplio de patógenos está poniendo de manifiesto un número creciente de infecciones mixtas, cuya importancia aún desconocemos. Se espera que la cuantificación de la carga de los patógenos implicados mediante nuevos métodos moleculares (p. ej., TAAN en tiempo real) pueda generar información que permita superar estas limitaciones. Pese a los grandes avances efectuados en años recientes, queda mucho por investigar en este terreno, investigación a la que, desde esta pequeña revisión, animamos a los lectores.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores han declarado no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Fine MJ, Smith MA, Carson CA, Mutha SS, Sankey SS, Weissfeld LA, et al. Prognosis and outcomes of patients with community-acquired pneumonia. *JAMA*. 1996;275:134-41.
2. Garau J, Calbo E. Community-acquired pneumonia. *Lancet*. 2008;371:455-8.
3. Woodhead M. Community-acquired pneumonia in Europe: causative pathogens and resistance patterns. *Eur Respir J*. 2002;36:20S-27S.
4. Ruiz-Gonzalez A, Falguera M, Nogues A, Rubio-Caballero M. Is *Streptococcus pneumoniae* the leading cause of pneumonia of unknown etiology? A microbiologic study of lung aspirates in consecutive patients with community-acquired pneumonia. *Am J Med*. 1999;106:385-90.
5. Waites KB, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17:697-728.
6. Kuo CC, Jackson LA, Campbell LA, Grayston JT. Chlamydia pneumoniae (TWAR). *Clin Microbiol Rev*. 1995;8:451-61.
7. Montes M, Cilla G, Vicente D, Nieto V, Ercibengoa M, Perez-Trallero E. Gipuzkoa, Basque Country, Spain (1984-2004): a hyperendemic area of Q fever. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1078:129-32.
8. Pozo F, Casas I, Ruiz G, Falcón A, Pérez-Breña P. Aplicación de los métodos moleculares al diagnóstico y estudio epidemiológico de las infecciones respiratorias causadas por virus. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26(Supl 9): 15-25.
9. Dagan R, Shriker O, Hazan I, Leibovitz E, Greenberg D, Schlaeffer F, et al. Prospective study to determine clinical relevance of detection of pneumococcal DNA in sera of children by PCR. *J Clin Microbiol*. 1998;36:669-73.
10. Llull D, Lopez R, Garcia E. Characteristic signatures of the *lytA* gene provide a basis for rapid and reliable diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections. *J Clin Microbiol*. 2006;44:1250-6.
11. Carvalho Mda G, Tondella ML, McCaustland K, Weidlich L, McGee L, Mayer LW, et al. Evaluation and improvement of real-time PCR assays targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of pneumococcal DNA. *J Clin Microbiol*. 2007;45:2460-6.
12. Lorente ML, Falguera M, Nogués A, González AR, Merino MT, Caballero MR. Diagnosis of pneumococcal pneumonia by polymerase chain reaction (PCR) in whole blood: a prospective clinical study. *Thorax*. 2000;55:133-7.
13. Kearns AM, Graham C, Burdett D, Heatherington J, Freeman R. Rapid real-time PCR for determination of penicillin susceptibility in pneumococcal meningitis, including culture-negative cases. *J Clin Microbiol*. 2002;40: 682-4.
14. Abdeldaim GM, Strålin K, Olcén P, Blomberg J, Herrmann B. Toward a quantitative DNA-based definition of pneumococcal pneumonia: a compar-

- son of *Streptococcus pneumoniae* target genes, with special reference to the Spn9802 fragment. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;60:143-50.
15. Johansson N, Kalin M, Giske CG, Hedlund J. Quantitative detection of *Streptococcus pneumoniae* from sputum samples with real-time quantitative polymerase chain reaction for etiologic diagnosis of community-acquired pneumonia. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;60:255-61.
 16. Yang S, Lin S, Khalil A, Gaydos C, Nuemberger E, Juan G, et al. Quantitative PCR assay using sputum samples for rapid diagnosis of pneumococcal pneumonia in adult emergency department patients. *J Clin Microbiol.* 2005;43:3221-6.
 17. Montes M, Cilla G, Alcorta M, Pérez-Trallero E. High prevalence of *Chlamydia pneumoniae* infection in children and young adults in Spain. *Pediatr Infect Dis J.* 1992;11:972-3.
 18. Schmidt SM, Muller CE, Mahner B, Wiersbitzky SK. Prevalence, rate of persistence and respiratory tract symptoms of *Chlamydia pneumoniae* infection in 1211 kindergarten and school age children. *Pediatr Infect Dis J.* 2002;21:758-62.
 19. Hammerschlag MR. *Chlamydia* and *Chlamydiales*: beyond *Chlamydia trachomatis*. *Pediatr Infect Dis J.* 2007;26:639-40.
 20. Rattei T, Ott S, Gutacker M, Rupp J, Maass M, Schreiber S, et al. Genetic diversity of the obligate intracellular bacterium *Chlamydia pneumoniae* by genome-wide analysis of single nucleotide polymorphisms: evidence for highly clonal population structure. *BMC Genomics.* 2007;8:355.
 21. Dowell SF, Peeling RW, Boman J, Carlone GM, Fields BS, Guarner J, et al. Standardizing *Chlamydia pneumoniae* assays: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada). *Clin Infect Dis.* 2001;33:492-503.
 22. Kumar S, Hammerschlag MR. Acute respiratory infection due to *Chlamydia pneumoniae*: current status of diagnostic methods. *Clin Infect Dis.* 2007;44:568-76.
 23. Rätty R, Rönkö E, Kleemola M. Sample type is crucial to the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia by PCR. *J Med Microbiol.* 2005;54: 287-91.
 24. Strålin K. Usefulness of aetiological tests for guiding antibiotic therapy in community-acquired pneumonia. *Int J Antimicrob Agents.* 2008;31:3-11.
 25. Murdoch DR. Diagnosis of *Legionella* infection. *Clin Infect Dis.* 2003;36:64-9.
 26. Fields, Barry S, Benson, Robert F, Besser, Richard E. *Legionella* and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation *Clin Microbiol Rev.* 2002;15:506-26.
 27. Yu VL, Plouffe JF, Pastoris MC, Stout JE, Schousboe M, Widmer A, et al. Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: An international collaborative survey. *J Infect Dis.* 2002;186:127-8.
 28. Roig J, Domingo C, Morera J. Legionnaires' disease. *Chest.* 1994;105:1817-25.
 29. Domínguez J, Galí N, Matas L, Pedrosa P, Hernández A, Padilla E, et al. Evaluation of a rapid immunochromatographic assay for the detection of *Legionella* antigen in urine samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1999;18: 896-8.
 30. Reischl U, Linde HJ, Lehn N, Landt O, Barratt K, Wellinghausen N. Direct detection and differentiation of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* in clinical specimens by dual-color real-time PCR and melting curve analysis. *J Clin Microbiol.* 2002;40:3814-7.
 31. Diederer BM, Kluytmans JA, Vandenbroucke-Grauls CM, Peeters MF. Utility of real-time PCR for diagnosis of Legionnaires' disease in routine clinical practice. *J Clin Microbiol.* 2008;46:671-7.
 32. Herpers BL, De Jongh BM, Van der Zwaluw K, Van Hanne E. Real-Time PCR assay targets the 23S-5S spacer for direct detection and differentiation of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:4815-6.
 33. Bencini MA, Van den Brule, AJC, Claas ECJ, Hermans MHA, Melchers WJG, Noordhoek GT, et al. Multicenter comparison of molecular methods for detection of *Legionella* spp. in sputum samples *J Clin Microbiol.* 2007;45:3390-2.
 34. Lindsay DS, Abraham WH, Findlay W, Christie P, Johnston F, Edwards GF. Laboratory diagnosis of legionnaires' disease due to *Legionella pneumophila* serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods. *J Med Microbiol.* 2004;53:183-7.
 35. Diederer BM, De Jong CM, Kluytmans JA, Van der Zee A, Peeters MF. Detection and quantification of *Legionella pneumophila* DNA in serum: case reports and review of the literature. *J Med Microbiol.* 2006;55:639-42.
 36. Maiwald M, Schill M, Stockinger C, Helbig JH, Lück PC, Witzleb W, et al. Detection of *Legionella* DNA in human and guinea pig urine samples by the polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1995;14:25-33.
 37. Orta Mira N, Guna Serrano MR, Gimeno Cardona C, Pérez JL. Control de calidad en microbiología molecular. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008;26 (Supl 9):2-7.
 38. The European Guidelines for Control and Prevention of Travel Associated Legionnaires' Disease. Microbiological case definitions. En: http://www.ewgli.org/data/european_guidelines/eg_appendix1.pdf
 39. Vincart B, De Mendonça R, Rottiers S, Vermeulen F, Struelens MJ, Denis O. A specific real-time PCR assay for the detection of *Bordetella pertussis*. *J Med Microbiol.* 2007;56:918-20.
 40. Glare EM. Analysis of a repetitive sequence from *Bordetella pertussis* and its application to the diagnosis of pertussis using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1990;28:1982-7.
 41. Arico B, Rappuoli R. *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* contain transcriptionally silent pertussis toxin genes. *J Bacteriol.* 1987;169:2847-53.
 42. Templeton KE, Scheltinga SA, Van der Zee A, Diederer BMW, Kruijssen AM, Goossens H, et al. Evaluation of Real-Time PCR for detection of and discrimination between *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella holmesii* for clinical diagnosis. *J Clin Microbiol.* 2003;41:4121-6.
 43. Register KB, Sanden GN. Prevalence and sequence variants of IS481 in *Bordetella bronchiseptica*: implications for IS481-based detection of *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol.* 2006;44:4577-83.
 44. Kösters K, Reischl U, Schmetz J, Riffelmann M, Wirsing von König CH. Real-time LightCycler PCR for detection and discrimination of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. *J Clin Microbiol.* 2002;40:1719-22.
 45. García-Martínez J, Chaves F, Salto E, Otero JR. *Bordetella pertussis* detection by real-time PCR, immunofluorescence and culture: prospective evaluation and molecular epidemiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006;24:500-4.