



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

Comparación de cinco ensayos comerciales para la detección de antígenos de *Legionella pneumophila* en orina

Fernando de Ory* y Teodora Minguito

Servicio de Microbiología Diagnóstica, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 8 de noviembre de 2007

Aceptado el 27 de marzo de 2008

On-line el 5 de febrero de 2009

Palabras clave:

Antigenuria

Legionella pneumophila

Enzimoimmunoanálisis

Inmunocromatografía

RESUMEN

Objetivo: la detección de antigenuria es la herramienta fundamental para el diagnóstico de la infección por *Legionella*. El objetivo es comparar cinco métodos disponibles comercialmente para la detección de antígenos solubles de *Legionella pneumophila* en orina.

Métodos: se han estudiado 71 muestras de orina procedentes de casos de infección por la bacteria (62 muestras) o de casos de infección por virus respiratorio sincitial (9 casos). Las muestras se han analizado para la detección de antígenos solubles de *L. pneumophila* por métodos inmunoenzimáticos (ELISA) (Binax y Bartels) e inmunocromatográficos (IC) (Binax, SAS y Uni-Gold).

Resultados: se ha obtenido resultado idéntico en los cinco análisis en 52 muestras (73,2%) (35 positivas y 17 negativas). Las muestras con resultado discrepante se han clasificado por el criterio de la mayoría de los resultados y/u otros resultados de laboratorio (serología) y/o antecedentes epidemiológicos. Así han sido finalmente clasificadas como positivas 51 muestras, y como negativas, las 20 restantes. Los valores de sensibilidad de ELISA-Binax, ELISA-Bartels, IC-Binax, IC-SAS e IC-Uni-Gold han sido del 80,4, el 100, el 82,4, el 86,3 y el 70,6%, respectivamente. Los valores correspondientes de especificidad han sido del 90, el 95, el 100, el 95 y el 100%.

Conclusiones: los resultados indican que los métodos evaluados son adecuados al diagnóstico de la infección por *Legionella*, con algunas reservas en cuanto a la sensibilidad de alguno de ellos.

© 2007 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Comparison of five commercial assays for the detection of *Legionella pneumophila* antigens in urine

ABSTRACT

Objective: Antigenuria detection is the main approach for diagnosing *Legionella* infections. The aim of this study was to compare 5 commercially available methods for detecting *Legionella pneumophila* soluble antigens in urine.

Methods: Seventy-one urine samples were tested, 62 from patients with bacterial infection and 9 from patients with respiratory syncytial virus infection. All samples were assayed for the presence of *L. pneumophila* by immunoenzymatic (ELISA) (Binax and Bartels), and immunochromatographic (IC) (Binax, SAS and Uni-Gold) methods.

Results: Identical results (35 positive and 17 negative) were obtained by the 5 assays in 52 samples (73.2%). Samples showing discrepant results were classified by the majority criterion, and/or other laboratory results (serology), and/or epidemiological findings. On this basis, 51 samples were ultimately classified as positive, and 20 as negative. Sensitivity values of ELISA-Binax, ELISA-Bartels, IC-Binax, IC-SAS and IC-Uni-Gold were 80.4, 100, 82.4, 86.3, and 70.6%, respectively. Corresponding values for specificity were 90, 95, 100, 95 and 100%.

Conclusions: The results indicate that the methods compared are all adequate for diagnosing *Legionella* infection, although some have certain limitations regarding sensitivity.

© 2007 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Keywords:

Antigenuria

Legionella pneumophila

Enzyme immunoassay

Immunochromatography

Introducción

La infección por *Legionella pneumophila* es una causa importante de neumonía adquirida en la comunidad en España, que ocasiona brotes de importancia^{1,2}. El diagnóstico directo de la

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: fory@isciii.es (F. de Ory).

infección por *L. pneumophila* se puede realizar mediante inmunofluorescencia directa, aproximación que adolece de cierta falta de especificidad y es muy poco sensible^{3,4}, y que adicionalmente se complica por la dificultad de producir esputo que tienen los pacientes con legionelosis, así como por el requerimiento de personal altamente cualificado para la correcta interpretación de los resultados. El aislamiento de la bacteria requiere el uso de medios específicos, toma varios días y es relativamente poco sensible^{3,4}, por lo que no resulta una aproximación útil para el diagnóstico. Sin embargo, es el método más adecuado para la correcta caracterización epidemiológica de brotes, ya que permite establecer la relación con otros aislados de otros pacientes o de muestras ambientales. Por otra parte, el diagnóstico serológico, realizado por inmunofluorescencia indirecta (IFI), muestra buena sensibilidad^{3,4} y es de gran utilidad para la caracterización etiológica de los casos, aunque no resulta aplicable al diagnóstico, puesto que se precisa el estudio de muestras separadas 15–20 días para evidenciar la seroconversión. Con estos antecedentes, la detección de antígenos solubles en orina es la aproximación diagnóstica fundamental para el diagnóstico de la infección por *Legionella* por los valores adecuados de sensibilidad y especificidad^{3–5}, y porque que se obtienen resultados en pocos minutos o pocas horas, según el ensayo empleado, y de esta manera permite establecer el tratamiento antibiótico específico más adecuado de forma inmediata⁶.

En los últimos años se han comercializado métodos basados tanto en técnica inmunoenzimática (ELISA) como inmunocromatográfica (IC) para la detección de antígenos solubles de *L. pneumophila* en orina que han permitido generalizar el diagnóstico en laboratorios clínicos y en urgencias. En el presente estudio se comparan las características de funcionamiento de cinco de estos ensayos para la determinación de antígenos solubles de *L. pneumophila* en orina.

Material y método

Se ha empleado un total de 71 muestras de orina, agrupadas como sigue:

- 34 muestras de casos de neumonía procedentes de 2 brotes de infección por *Legionella* ocurridos en 1996 (brote 1) (14 casos, 15 muestras) y en 2000 (brote 2) (19 muestras de 19 casos). Entre las del brote 1 fueron positivas por ELISA-Binax 7 muestras sin concentrar, 3 más después de concentrar 25x, y las 5 restantes fueron negativas. Entre las muestras del brote 2 fueron positivas por ELISA-Binax 10 muestras sin concentrar, 4 más después de concentrar 25x, y las 5 restantes fueron negativas.
- 28 muestras de casos esporádicos de neumonía, ocurridos entre 1999 y 2001, de las que 26 fueron positivas en ELISA-Binax sin concentrar, y las 2 restantes lo fueron después de concentrar 25x.
- 9 muestras de niños con infección respiratoria por virus respiratorio sincitial (VRS), recogidas en 2001, todas ellas negativas en ELISA-Binax, tanto en orina completa como en orina concentrada 25x.

Todas las muestras se analizaron, tanto concentradas como sin concentrar, a su recepción mediante ELISA-Binax (*Legionella urinary antigen enzyme immunoassay kit*, Binax, Portland, Estados Unidos), alicuotadas en viales de 5 ml, y congeladas a -20°C .

Las muestras se analizaron por ELISA-Binax, IC-Binax (Binax Now *Legionella urinary antigen test*, Binax), durante 1998–2001, ELISA-Bartels (ELISA-Bartels, *Legionella urinary antigen*, Bartels, Trinity Biotech, Wicklow, Irlanda), durante 2001, IC-SAS (SAS

Legionella Test, SA Scientific, San Antonio, Texas, Estados Unidos), durante 2006, e IC-Uni-Gold (Uni-Gold *Legionella urinary antigen rapid test*, Trinity Biotech, Wicklow, Irlanda), durante 2007. Todos los análisis evaluados han sido diseñados para la detección de antígenos solubles de *L. pneumophila* serogrupo (SG) 1. En todos los casos las pruebas se han llevado a cabo siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

Para asegurar la reactividad de las muestras, conservadas hasta 10 años, se volvió a analizarlas en 2006 mediante ELISA-Bartels.

La concentración de muestras de orina se realizó por ultrafiltración selectiva, mediante el kit Minicon B15 (Amicon, Millipore, Estados Unidos).

Se realizaron determinaciones de anticuerpos en suero frente a *L. pneumophila* SG1 en muestras de 9 pacientes (casos 1 a 9, tabla 1) para lo que se utilizó la técnica de IFI, siguiendo un procedimiento estándar⁷.

Resultados

Con el análisis realizado durante 2006 mediante ELISA-Bartels se obtuvieron resultados cualitativos equivalentes a los que se obtuvieron en el estudio inicial, por lo que el panel se consideró adecuado para la comparación de los análisis.

Se ha obtenido resultado idéntico en los cinco análisis en 52 (73,2%) muestras (35 positivas y 17 negativas, incluidas entre estas las muestras de niños con infección respiratoria por VRS). Las 19 muestras con resultado discrepante se relacionan en la tabla 1. De éstas, 13 procedían de brotes de infección por la bacteria; 9 muestras (1 a 9) eran de casos que mostraban seroconversión o título alto frente a *L. pneumophila* SG1. Las 4 muestras restantes (10 a 13), de las que no se disponía de otros

Tabla 1
Resultados discrepantes obtenidos por los métodos comparados*

	Brote	ELISA			Inmunocromatográficos			Otros datos	Clasificación
		Bartels	Binax (25x)		Binax	SAS	Uni-Gold		
1	Sí	Pos	Neg* (Neg)	Neg*	Neg*	Neg*	SC	Positivo	
2	Sí	Pos	Neg* (Neg)	Neg*	Neg*	Neg*	SC	Positivo	
3	Sí	Pos	Neg* (Pos)	Neg*	Pos	Neg*	SC	Positivo	
4	Sí	Pos	Neg* (Pos)	Pos	Pos	Pos	SC	Positivo	
5	Sí	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg*	SC	Positivo	
6	Sí	Pos	Neg* (Pos)	Neg*	Neg*	Neg*	TA	Positivo	
7	Sí	Pos	Neg* (Neg)	Neg*	Neg*	Neg*	TA	Positivo	
8	Sí	Pos	Neg* (Neg)	Neg*	Neg	Neg*	TA	Positivo	
9	Sí	Pos	Neg (Neg)	Neg	Pos	Neg*	TA	Positivo	
10	Sí	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg*	sd	Positivo	
11	Sí	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg*	sd	Positivo	
12	Sí	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg*	sd	Positivo	
13	Sí	Pos	Neg* (Pos)	Pos	Neg*	Neg*	sd	Positivo	
14	No	Pos	Pos	Pos	Neg*	Neg*	sd	Positivo	
15	No	Pos	Neg* (Pos)	Neg*	Pos	Neg*	sd	Positivo	
16	No	Pos	Pos	Neg*	Pos	Neg*	sd	Positivo	
17	No	Pos*	Neg (Pos)	Neg	Neg	Neg	sd	Negativo	
18	No	Neg	Pos*	Neg	Pos*	Neg	sd	Negativo	
19	No	Neg	Pos*	Neg	Neg	Neg	sd	Negativo	

SC: seroconversión; sd: sin datos adicionales; TA: título (1/256 frente a *L. pneumophila* SG1).

* Resultados discrepantes en relación con la clasificación de casos.

datos de laboratorio, mostraron resultado positivo en al menos 3 de los métodos empleados, y se las clasificó como positivas; 6 muestras más (14 a 19) eran de casos esporádicos. En ninguno de estos casos se dispuso de datos adicionales de laboratorio. Tres de estas muestras se clasificaron como positivas (muestras 14 a 16), ya que se obtuvo resultado positivo en al menos tres de los análisis, en tanto que las tres muestras restantes se clasificaron como negativas, por mostrar resultado positivo en dos análisis (muestras 17 y 18) o sólo en uno (muestra 19). De acuerdo con esta clasificación de casos, finalmente se ha considerado positivas 51 muestras, y negativas las 20 restantes.

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos por cada uno de los métodos, de acuerdo con la clasificación final de las muestras. Los valores de sensibilidad de los análisis evaluados han variado desde el 70,6% (IC-Uni-Gold) hasta el 100% (ELISA-Bartels). La especificidad, por otra parte, varió entre el 90% (ELISA-Binax) y el 100% (IC-Binax e IC-Uni-Gold).

Discusión

El método de elección para el diagnóstico de la infección por *Legionella* es la detección de antígenos solubles en orina, dadas las dificultades que hay para aplicar otros métodos de diagnóstico directo, como el aislamiento, por la baja sensibilidad, o la detección directa, por la baja sensibilidad y las limitaciones de especificidad. La aplicación de técnicas para la detección de antígenos solubles en orina ha facilitado el diagnóstico de la infección por *Legionella*, puesto que se realiza sobre muestra fácilmente accesible, y ofrece unos valores muy adecuados de sensibilidad, con una excelente especificidad³⁻⁵. Con la inclusión

de determinaciones de antígeno en orina, se ha incrementado el número de casos notificados. Así, en 1997 se declararon a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica 191 casos y 1.343 en 2006⁸.

En la actualidad, hay varios métodos para la detección de antígenos solubles de *Legionella*; la mayor parte de ellos están diseñados para detectar antígenos del SG 1, que es la causa de la mayor parte de los casos de neumonía⁹. En primer término se desarrollaron métodos de aglutinación de partículas de látex, que mostraron ser poco adecuados¹⁰. Con la aplicación de técnicas de radioinmunoanálisis⁵, de diferentes métodos de ELISA¹¹⁻¹³ e inmunocromatográficos¹⁴, se han demostrado las buenas características de funcionamiento de los tests de antigenuria. En la actualidad hay métodos disponibles comercialmente de ELISA e inmunocromatográficos para la detección de antígenos solubles, que permiten el diagnóstico de la infección por *Legionella* de forma eficaz. Se han comparado cinco de estos métodos. Las mejores condiciones para la evaluación de métodos para la detección de antígenos en orina incluyen el análisis de muestras recién obtenidas, lo que no resulta siempre posible, teniendo en cuenta las dificultades de obtener muestras positivas de forma prospectiva. Alternativamente, se puede recurrir al uso de colecciones de muestras mantenidas en buenas condiciones de conservación. Para el presente estudio se ha empleado una colección de orinas obtenidas entre 1996 y 2001, y conservadas en alícuotas a -20 °C. Se consideró que las muestras y los resultados históricos eran adecuados para esta comparación al reanalizarlas en 2006, con el mismo método del que se disponía de resultado en 2001 (ELISA-Bartels), y obtener resultados cualitativos equivalentes en todas las muestras.

La sensibilidad de los análisis comparados ha estado por encima del 70% en todos los casos, y la especificidad por encima del 90%. Las mejores cifras de sensibilidad se han obtenido para el ELISA-Bartels, que ha identificado como positivos al 100% de los casos clasificados como positivos. Esta excelente sensibilidad ya ha sido documentada^{13,15}. ELISA-Binax ha mostrado una sensibilidad del 80,4%, debido a que en 10 muestras clasificadas como positivas se ha obtenido resultado negativo. En 5 de éstas, sin embargo, se obtuvo resultado positivo después de concentrar por ultrafiltración selectiva, de esta manera se confirmó que la concentración de la muestra aumenta la sensibilidad de los tests de antigenuria¹¹.

Entre los análisis inmunocromatográficos, la mejor sensibilidad se ha obtenido con el IC-SAS (86,3%), aunque un estudio previo ha encontrado que muestra menor sensibilidad que el IC-Binax en orinas sin concentrar (el 82,9 frente al 91,4%)¹⁶. Hasta este momento no hay datos acerca de las características de funcionamiento del análisis IC-Uni-Gold.

En lo que se refiere a la especificidad, los mejores valores han sido de IC-Binax e IC-Uni-Gold (100%), en tanto que ELISA-Binax mostró valores del 90% (2 resultados falsos positivos, uno de ellos único en este ensayo) y ELISA-Bartels e IC-SAS, del 95% (1 resultado falso positivo). Sin embargo, es bien reconocido que la detección de antígenos en orina es una aproximación muy específica para el diagnóstico de *Legionella*³⁻⁵; por lo tanto, no se puede excluir que, a pesar de los criterios aquí empleados, todos los resultados positivos sean verdaderos resultados positivos, por las concentraciones bajas de antígeno presentes en la muestra. Esto justificaría los resultados clasificados como negativos falsos obtenidos en la mayoría de los análisis sobre muestras procedentes de brotes, situación en la que, por la intensa investigación epidemiológica, se estudian casos menos graves, en los que la sensibilidad de los análisis es menor^{13,17,18}.

Como conclusión, los resultados indican que los métodos evaluados son adecuados al diagnóstico de la infección por *Legionella*, con algunas reservas en cuanto a la sensibilidad de alguno de ellos.

Tabla 2

Comparación de los resultados obtenidos por ELISA-Binax, ELISA-Bartels, IC-Binax, IC-SAS e IC-Uni-Gold después de la clasificación final de los casos

	Referencia	
	Positivo (n = 51)	Negativo (n = 20)
ELISA-Binax		
Positivo (n = 43)	41	2
Negativo (n = 28)	10	18
Sensibilidad del 80,4% (41/51)		
Especificidad del 90% (18/20)		
ELISA-Bartels		
Positivo (n = 52)	51	1
Negativo (n = 19)	0	19
Sensibilidad del 100% (51/51)		
Especificidad del 95% (19/20)		
IC-Binax		
Positivo (n = 42)	42	0
Negativo (n = 29)	9	20
Sensibilidad del 82,4% (42/51)		
Especificidad del 100% (20/20)		
IC-SAS		
Positivo (n = 45)	44	1
Negativo (n = 26)	7	19
Sensibilidad del 86,3% (44/51)		
Especificidad del 95% (19/20)		
IC-Uni-Gold		
Positivo (n = 36)	36	0
Negativo (n = 35)	15	20
Sensibilidad del 70,6% (36/51)		
Especificidad del 100% (20/20)		

Bibliografía

- Jericó Alba C, Nogués Solán X, Santos Martínez MJ, Félez Flor M, Garcés Jarque JM, Mariñosa Marré M, et al. Brote epidémico de neumonía comunitaria por *Legionella pneumophila* en Barcelona: «el brote de la Barceloneta». Efecto del diagnóstico y tratamiento precoz. *Rev Clin Esp.* 2004;204:70–4.
- Barrufet-Barqué MP, Sauca-Subías G, Force-Sanmartín L, Felip-Benach A, Martínez-Pérez E, Capdevila-Morell JA. Estudio de un brote de infección por *Legionella pneumophila*. *Med Clin (Barc).* 2006;126:178–82.
- 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.
- Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15:506–26.
- Plouffe JF, File TM, Breiman RF, Hackman BA, Salstrom SJ, Marston BJ, et al. Reevaluation of the definition of Legionnaires' disease: use of the urinary antigen assay. Community Based Pneumonia Incidence Study Group. *Clin Infect Dis.* 1995;20:1286–91.
- Alfageme I, Aspa J, Blanquer J, Blanquer R, Borderías L, Bravo C, et al. Normativas para el diagnóstico y el tratamiento de la neumonía adquirida en la comunidad. Sociedad Española de Neumología y cirugía Torácica (SEPAR). *Arch Bronconeumol.* 2005;41:272–89.
- De Ory F, Echevarría JM, Pelaz C, Téllez A, Mateo MA, López J. Detection of specific IgM antibody in the investigation of an outbreak of pneumonia due to *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Clin Microbiol Infect.* 2000;6:64–8.
- Instituto de Salud Carlos III, Centro Nacional de Epidemiología, Vigilancia Epidemiológica, Enfermedades, Series Temporales Anuales. Situación de las enfermedades de declaración obligatoria. España. Años 1997 y 2006. Disponible en: <http://www.isciii.es/jsps/centros/epidemiologia/seriesTemporalesAnuales.jsp>.
- Marston BJ, Lipman HB, Breiman RF. Surveillance for Legionnaires' disease. Risk factors for morbidity and mortality. *Arch Intern Med.* 1994;154:2417–22.
- Leland DS, Kohler RB. Evaluation of the CLONE *Legionella pneumophila* serogroup 1 urine antigen latex test. *J Clin Microbiol.* 1991;29:2220–3.
- Dominguez JA, Matas L, Manterola JM, Blavia R, Sopena N, Belda FJ, et al. Comparison of radioimmunoassay and enzyme immunoassay kits for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in both concentrated and nonconcentrated urine samples. *J Clin Microbiol.* 1997;35:1627–9.
- Harrison T, Uldum S, Alexiou-Daniel S, Bangsborg J, Bernander S, Drasar V, et al. A multicenter evaluation of the Biotest *Legionella* urinary antigen EIA. *Clin Microbiol Infect.* 1998;4:359–65.
- De Ory F. Evaluación de un nuevo ensayo de ELISA para la detección de antígeno de *Legionella pneumophila*, en orina. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2002;20:106–9.
- De Ory F. Evaluación del Binax Now *Legionella* Urinary Antigen Test para la detección de antígeno en orina. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1999;17:314–5.
- Guerrero C, Toldos CM, Yagüe G, Ramírez C, Rodríguez T, Segovia M. Comparison of diagnostic sensitivities of three assays (Bartels enzyme immunoassay [EIA], Biotest EIA, and Binax NOW immunochromatographic test) for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine. *J Clin Microbiol.* 2004;42:467–8.
- Diederer BM, Peeters MF. Evaluation of the SAS *Legionella* Test, a new immunochromatographic assay for the detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13:86–8.
- Wever PC, Yzerman EP, Kuijper EJ, Speelman P, Dankert J. Rapid diagnosis of Legionnaires' disease using an immunochromatographic assay for *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine during an outbreak in the Netherlands. *J Clin Microbiol.* 2000;38:2738–9.
- Blázquez RM, Espinosa FJ, Martínez-Toldos CM, Alemany L, García-Orenes MC, Segovia M. Sensitivity of urinary antigen test in relation to clinical severity in a large outbreak of *Legionella pneumonia* in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005;24:488–91.