



# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



## Métodos moleculares de diagnóstico de infecciones respiratorias. ¿Ha cambiado el esquema diagnóstico?

Jordi Vila Estapé\*, Yuliya Zboromyrska, Andrea Vergara Gómez, Izaskun Alejo Cancho, Elisa Rubio García, Miriam José Álvarez-Martínez, Jorge Puig de la Bellacasa Brugada y M. Ángeles Marcos Maeso

Servicio de Microbiología, Centro de Diagnóstico Biomédico, Hospital Clínic, ISGlobal, Centre for International Health Research (CRESIB), Barcelona, España

### RESUMEN

**Palabras clave:**

Infecciones respiratorias  
Bacterias  
Virus  
Hongos  
Diagnóstico rápido

Las infecciones respiratorias bajas siguen siendo una de las causas más frecuentes de mortalidad en todo el mundo, de ahí que el diagnóstico precoz sea fundamental. Tradicionalmente, el diagnóstico microbiológico de este tipo de infecciones se ha basado en métodos convencionales que incluyen cultivos en medios artificiales para aislamiento de bacterias y hongos y cultivos celulares para virus, así como en la detección antigénica o de anticuerpos mediante reacciones antígeno-anticuerpo.

El principal inconveniente de las metodologías anteriormente citadas es el tiempo necesario para obtener un diagnóstico etiológico de la infección. Las técnicas basadas en la biología molecular han irrumpido con fuerza en las últimas décadas como herramientas de diagnóstico rápido de las infecciones. Algunas de estas técnicas —sobre todo aquellas que pueden detectar diversos microorganismos en la misma reacción— acostumbran a ser caras, por lo que la cuestión que se plantea es si el gasto de tales ensayos se ve justificado por la información obtenida y por el impacto clínico que su implementación determina.

En este artículo se pretende hacer una revisión de las diversas técnicas de biología molecular aplicadas al diagnóstico de las infecciones respiratorias, centrándose fundamentalmente en la neumonía, y analizar el impacto que pueden tener en el manejo del paciente con infección respiratoria aguda.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

### Molecular diagnostic methods of respiratory infections. Has the scheme diagnosis changed?

#### ABSTRACT

**Keywords:**

Respiratory tract infections  
Bacteria  
Virus  
Fungi  
Rapid diagnosis

Lower respiratory tract infections remain one of the most common causes of mortality worldwide, which is why early diagnosis is crucial. Traditionally the microbiological diagnosis of these infections has been based on conventional methods including culture on artificial media for isolation of bacteria and fungi and cell cultures for virus and antibody or antigen detection using antigen-antibody reactions.

The main drawback of the above mentioned methods is the time needed for an etiological diagnosis of the infection. The techniques based on molecular biology have drawn much attention in recent decades as tools for rapid diagnosis of infections. Some techniques are very expensive, especially those that can detect various microorganisms in the same reaction, therefore the question that arises is whether the cost of such testing is justified by the information obtained and by the clinical impact that its implementation will determine.

In this article we make a review of the various techniques of molecular biology applied to the diagnosis of pneumonia and focus primarily on analysing the impact they may have on the management of patients with acute respiratory tract infections.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

\*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jvila@clinic.ub.es (J. Vila Estapé).

## Introducción

Las infecciones respiratorias se pueden clasificar en 2 grupos: las de vías respiratorias altas y las de vías respiratorias bajas. Entre las primeras se incluyen rinitis, faringitis, amigdalitis, faringoamigdalitis, otitis media, sinusitis, laringitis y epiglotitis, estas 2 últimas consideradas por algunos autores como infecciones de vías respiratorias intermedias. La mayoría de las infecciones de vías respiratorias altas presentan un curso benigno y autolimitado y están causadas por virus. Entre las infecciones de vías respiratorias bajas se incluyen bronquitis, bronquiolitis y neumonías. Esta última infección es sin duda alguna la más importante de todas ellas. Las neumonías pueden estratificarse en neumonía adquirida en la comunidad, neumonías intrahospitalarias y, dentro de estas, en neumonía asociada a ventilación mecánica. Según el tipo de neumonía, la etiología es distinta (tabla 1).

Según la Organización Mundial de la Salud<sup>1</sup>, las infecciones respiratorias bajas siguen siendo una de las causas más frecuentes de mortalidad en todo el mundo, de ahí que el diagnóstico precoz sea fundamental. Tradicionalmente, el diagnóstico microbiológico de este tipo de infecciones se ha basado en lo siguiente: el aislamiento de bacterias, levaduras y hongos filamentosos mediante diversos medios de cultivo; el aislamiento de virus mediante cultivo celular, y la detección antigénica o de anticuerpos (pruebas serológicas) mediante inmunofluorescencia directa o enzimoimmunoensayo.

El principal inconveniente de las metodologías anteriormente citadas es el tiempo necesario para obtener un diagnóstico etiológico de la infección, que puede oscilar entre 24-72 h (en el caso de patógenos bacterianos) y hasta varias semanas (en el caso de cultivo de virus y hongos). Las técnicas basadas en la biología molecular han irrumpido con fuerza en las últimas décadas como herramientas de diagnóstico rápido de las infecciones. En este artículo se pretende hacer una revisión de las diversas técnicas de biología molecular aplicadas al diagnóstico de las infecciones respiratorias, centrándose fundamentalmente en la neumonía, y analizar el impacto que pueden tener en el manejo del paciente con infección respiratoria aguda.

## Detección de bacterias

En el caso de la neumonía adquirida en la comunidad destacan las infecciones por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis* y los microorganismos causantes de neumonía atípica como *Legionella* spp., *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae* y *Coxiella burnetii*<sup>2</sup>. En el caso de la neumonía nosocomial prevalecen más las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *S. aureus* y diversas enterobacterias<sup>3</sup> que con frecuencia presentan una mayor tasa de resistencias a los antimicrobianos<sup>4</sup>.

El esquema diagnóstico de referencia utilizado para identificar bacterias causantes de infecciones respiratorias sigue siendo el cultivo convencional semicuantitativo previa tinción de Gram a partir de la muestra directa, seguido de identificación y realización de antibiograma de los microorganismos patógenos<sup>5</sup>. Este proceso presenta una baja sensibilidad (especialmente si la muestra se ha tomado después de iniciar un tratamiento antibiótico), además de dificultad para diferenciar entre colonización e infección. Otro inconveniente es que el proceso requiere un tiempo mínimo de 2 días. En este período, muchos pacientes se tratan de forma empírica con antibióticos de amplio espectro. El tratamiento empírico puede ser inadecuado y aumentar la morbimortalidad de los pacientes. Por lo tanto, con el fin de disminuir el tiempo de identificación y orientar al clínico hacia un tratamiento adecuado lo antes posible, son necesarios métodos de diagnóstico rápido.

Los métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizan de forma rutinaria en algunos laboratorios de microbiología, principalmente para la identificación de microorganismos difíciles de cultivar o de lento crecimiento, como son los microorganismos causantes de neumonía atípica<sup>6</sup>. Una novedad en el diagnóstico molecular de infecciones respiratorias es el uso del sistema automatizado basado en la PCR a tiempo real, GeneXpert, a partir de secreciones del tracto respiratorio inferior para identificar *S. aureus* y su perfil de resistencia a meticilina en un período de 1 h. En un estudio reciente<sup>7</sup> se examinaron 135 aspirados traqueales de pacientes con sospecha de neumonía asociada a ventilación mecánica en los que se observaron estafilococos en racimo en la tinción de Gram.

**Tabla 1**  
Principales microorganismos causantes de neumonía

	Neumonía adquirida en la comunidad <sup>38,44-46</sup> (NAC)	Neumonía intrahospitalaria, incluida neumonía asociada a la ventilación mecánica <sup>47-50</sup>	Neumonía en el paciente inmunodeprimido <sup>51-54</sup>
Bacterias	<p>Bacterias grampositivas:</p> <p><i>Streptococcus pneumoniae</i>, <i>Staphylococcus aureus</i></p> <p>Bacterias gramnegativas:</p> <p><i>Haemophilus influenzae</i>, <i>Moraxella catarrhalis</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Klebsiella pneumoniae</i> y otras enterobacterias</p> <p>Bacterias atípicas:</p> <p><i>Mycoplasma pneumoniae</i>, <i>Legionella pneumophila</i>, <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>, <i>Coxiella burnetii</i></p> <p><i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex</p>	<p>Bacterias grampositivas:</p> <p><i>S. aureus</i>, <i>S. pneumoniae</i></p> <p>Bacterias gramnegativas:</p> <p><i>P. aeruginosa</i>, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>, <i>Acinetobacter baumannii</i>, <i>Escherichia coli</i>, <i>Enterobacter</i> spp., <i>K. pneumoniae</i> y otras enterobacterias, <i>H. influenzae</i></p> <p>Anaerobios</p>	<p>Bacterias grampositivas:</p> <p><i>S. aureus</i>, <i>S. pneumoniae</i>, <i>Nocardia</i> spp., <i>Rhodococcus equi</i></p> <p>Bacterias gramnegativas:</p> <p><i>P. aeruginosa</i>, <i>S. maltophilia</i>, <i>A. baumannii</i>, <i>E. coli</i>, <i>Enterobacter</i> spp., <i>K. pneumoniae</i> y otras enterobacterias, <i>Legionella</i> spp., <i>H. influenzae</i></p> <p><i>Mycobacterium</i> spp.</p>
Virus	<p>Virus de la gripe, VRS, adenovirus, rinovirus, metapneumovirus, virus parainfluenza, coronavirus</p>	<p>VRS, virus parainfluenza, rinovirus, virus de la gripe, CMV, VHS, coronavirus, rinovirus, metapneumovirus</p>	<p>NAC + CMV, VHS</p>
Hongos		<p><i>Aspergillus</i> spp., <i>Candida</i> spp., <i>Pneumocystis jirovecii</i></p>	<p><i>P. jirovecii</i>, <i>Aspergillus</i> spp., <i>Candida</i> spp., <i>Cryptococcus neoformans</i>, <i>Fusarium</i>, hongos endémicos</p>

CMV: citomegalovirus; VHS: virus del herpes simple; VRS: virus respiratorio sincitial.

**Tabla 2**  
Comparación de métodos moleculares comerciales para el diagnóstico de infecciones respiratorias

Técnica	Método	Diana	Tiempo de respuesta aproximado (horas)
eSensor Respiratory Virus Panel <sup>30</sup>	Microarray fase sólida/detección electroquímica	Inf (A, H1, H3, H1 2009, B), VRS (A, B), AdV (B/E, C), CoV (229E, OC43, NL63, HKU1), MpV, PiV (1, 2, 3), RnV	6
Verigen RV <sup>55</sup>	Multiplex RT-PCR/microarray fase sólida con nanopartículas de oro	Inf (A, H1, H3, H1 2009, B), VRS (A, B)	2
xTAG Respiratory Viral Panel <sup>55,56</sup>	Multiplex RT-PCR/microarray en suspensión/detección por citometría de flujo	Inf (A, H1, H3, H5, B), VRS (A, B), AdV, CoV (229E, OC43, NL63, HKU1), MpV, PiV (1, 2, 3, 4), RnV/EV, BoV	6,5-8
Multicode PLx RVP System <sup>57</sup>	Multiplex RT-PCR/microarray en suspensión/detección por código de barras	Inf (A, B), VRS (A, B), AdV (B, C, E), CoV (229E, OC43, NL63), MpV, PiV (1, 2, 3, 4a, 4b), RnV	4-4,5
ResPlex II Panel <sup>57</sup>	Multiplex RT-PCR/microarray en suspensión/detección con cámara LED	Inf (A, B), VRS (A, B), AdV (B, E), CoV (229E, OC43, NL63, HKU1), MpV, PiV (1, 2, 3), RnV, CxV/EcV, BoV.	5,5
CLART PneumoVir <sup>56,58</sup>	Multiplex RT-PCR/microarray de baja densidad/detección CAR <sup>®</sup>	Inf (A, H1, H3, H1 2009, B, C), VRS (A, B), AdV, CoV (229E, MpV (A, B), PiV (1, 2, 3, 4a, 4b), RnV, BoV, EV	9
Anyplex II RV16 <sup>59</sup>	Multiplex PCR tiempo real/TOCE/CMTA	Inf (A, H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H9, H10, H11, B), VRS (A, B), AdV (A-F), CoV (229E, OC43/ HKU1, NL63), MpV, PiV (1, 2, 3, 4), RnV (A-C), EV, BoV (1-4)	6-7
FilmArray Respiratory Panel <sup>30</sup>	Nested multiplex RT-PCR/análisis <i>melting</i>	Inf (A, H1, H3, H1 2009, B), VRS, AdV, CoV (229E, OC43, NL63, HKU1), MpV, PiV (1, 2, 3, 4), RnV/EV, BPer, MPne, CPne	1
Xpert <sup>®</sup> Flu/RSV XC; Xpert <sup>®</sup> Flu <sup>31</sup>	RT-PCR tiempo real/sondas fluorescentes	Inf (A, B), VRS; Inf (A, B, H1N1 2009)	1
FAST Track Diagnostic RP33 <sup>56</sup>	RT-PCR tiempo real/sondas marcadas	Inf (A, B, C), VRS, AdV, CoV (229E, OC43, NL63, HKU1), MpV, PiV (1, 2, 3, 4), RnV, EV, EcV, BoV; PcV, CMV, BPer, MPne, CPne, Leg, Pjir, SPne, Hlnf, Hlnf B, SAur, MCat, KPneu, Sal	3
Unyvero Pneumonia Application (UPA) (Curetis AG) <sup>13</sup>	Multiplex RT-PCR/Amplicon Detection by Array Hybridization	18 bacterias y <i>P. jirovecii</i> junto con 22 marcadores de resistencia	4
RespiFinder SMART 22 <sup>56</sup>	MLPA/electroforesis microcapilar	Inf (A, H1 2009, B), VRS (A, B), AdV, CoV (229E, OC43, NL63, HKU1), MpV, PiV (1, 2, 3, 4), RnV/EV, EcV, BoV; BPer, MPne, CPne, Leg	4
Seeplex RV15 <sup>58</sup>	DPO/electroforesis microcapilar	Inf (A, B), VRS (A, B), AdV, CoV (229E, OC43, NL63), MpV, PiV (1, 2, 3), RnV (A, B)	6-7

AdV: adenovirus; BoV: bocavirus; BPer: *Bordetella pertussis*; CAR<sup>®</sup>: *clinical array reader*; CMTA: *catcher melting-temperature analysis*; CMV: citomegalovirus; CoV: coronavirus; CPne: *Chlamydomphila pneumoniae*; CxV: coxsackievirus; DPO: *dual priming oligonucleotide*; EcV: echovirus; EV: Enterovirus; H1 2009: influenza A H1N1 pandémico; H1: influenza A H1N1 epidémico; Hlnf: *Haemophilus influenzae*; Inf: influenza; KPneu, *Klebsiella pneumoniae*; Leg: *Legionella* spp.; MCat: *Moraxella catharralis*; MLPA: *multiplex ligation-dependent probe amplification*; MPne: *Mycoplasma pneumoniae*; MpV: metapneumovirus; PcV: parechovirus; PiV: parainfluenzavirus; Pjir: *Pneumocystis jirovecii*; RnV: rinovirus; RT-PCR: *reverse transcription polymerase chain reaction*; Sal: *Salmonella* spp.; SAur: *Staphylococcus aureus*; SPne: *Streptococcus pneumoniae*; TOCE: *tagging oligonucleotide cleavage extensión*; VRS: virus respiratorio sincitial.

Se compararon los resultados obtenidos mediante cultivo cuantitativo y GeneXpert. Este último mostró una sensibilidad del 99% y una especificidad del 72,2%.

En los últimos años se han desarrollado técnicas moleculares basadas en la PCR múltiple que permiten identificar y cuantificar simultáneamente múltiples patógenos respiratorios a partir de diferentes tipos de muestras en un solo proceso. Diversas casas comerciales han desarrollado ensayos que permiten identificar virus y bacterias responsables de infecciones respiratorias en un período < 8 h. En la tabla 2 se resumen las características de algunos de ellos.

Recientemente ha emergido un nuevo grupo de técnicas moleculares basadas en la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos<sup>8</sup>. A diferencia de las PCR convencionales, en las que son necesarios una serie de ciclos de cambios de temperatura para que se produzca la amplificación de los ácidos nucleicos, estas técnicas permiten la amplificación a una temperatura constante. Las técnicas de amplificación isotérmica presentan sensibilidades y especificidades similares a las de la PCR, con la ventaja de requerir una instrumentación más sencilla y barata, por lo que podrían utilizarse en países de baja renta. Se han realizado numerosos ensayos que demuestran que estas técnicas son válidas para la identificación de los principales patógenos respiratorios<sup>9,10</sup>. En un estudio reciente, Zhang et al<sup>11</sup> aplicaron la

técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) para diagnóstico rápido de las principales bacterias patógenas (*S. pneumoniae*, *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *H. influenzae*) a partir de muestras de esputo. Analizaron 120 muestras de esputo de sospechas de exacerbaciones de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y se compararon los resultados obtenidos mediante LAMP y cultivo convencional; obtuvieron un mayor número de resultados positivos mediante el método LAMP y una mayor correlación entre los resultados de LAMP y los síntomas clínicos en comparación con los resultados del cultivo convencional.

Otro reto para el diagnóstico rápido de las infecciones respiratorias es la detección precoz del perfil de resistencias a antibióticos de las diversas bacterias<sup>12</sup>. El mayor obstáculo del uso de técnicas moleculares en la detección de resistencias es la discrepancia entre fenotipo y genotipo. Continuamente se descubren nuevos mecanismos de resistencia, con lo que la posible presencia de mecanismos desconocidos puede dar lugar a resultados falsos negativos mediante técnicas moleculares. Un problema adicional es la detección de marcadores genotípicos que fenotípicamente no comportan una resistencia clínicamente significativa. Esta complejidad es mucho mayor en bacterias gramnegativas que en grampositivas, ya que presentan más variedad de genes implicados en estos mecanismos. A pesar de los

inconvenientes que presentan las técnicas moleculares, una información precoz sobre el perfil de resistencias podría orientar hacia un mejor tratamiento empírico que la ausencia de información.

Actualmente hay un ensayo denominado “Curetis Unyvero P50 Pneumonia” basado en PCR múltiple capaz de detectar algunos marcadores de resistencia de bacterias responsables de infecciones respiratorias, incluyendo genes relacionados con la resistencia a beta-lactámicos (*mecA*, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>DHA</sub>, *bla*<sub>EB</sub>, *bla*<sub>OXA-51</sub> y *bla*<sub>KPC</sub>), a macrólidos (*ermB* y *mefA*) y a fluoroquinolonas (*gyrA83*, *gyrA87* y *parC*), y marcadores de integrones de clase 1 (*int1* y *sul1*)<sup>13</sup>.

### Detección de hongos

Las infecciones respiratorias causadas por hongos están aumentando debido, principalmente, a un incremento en la prevalencia de pacientes con riesgo de presentarlas (inmunodeprimidos, trasplantados, pacientes con EPOC, etc.)<sup>14</sup>. Además, la aparición de métodos diagnósticos más sensibles (como las técnicas moleculares) también contribuye a un aumento del número de casos diagnosticados.

El diagnóstico clásico de las infecciones fúngicas se basa en el cultivo y en la histología, técnicas que en ocasiones son lentas y menos sensibles de lo deseable debido a la propia naturaleza de los agentes implicados. Por otra parte, la identificación del hongo aislado puede ser complicada y requiere personal formado, ya que se basa principalmente en sus características fenotípicas, que en ocasiones no pueden identificar con exactitud la especie, algo imprescindible actualmente debido al gran número de especies nuevas de reciente descripción, muchas de ellas morfológicamente idénticas a otras ya conocidas.

En consecuencia, las técnicas de diagnóstico molecular para la detección de hongos se emplean cada vez más y su desarrollo está en pleno auge. Estas técnicas posibilitan un diagnóstico rápido y certero, que repercute de forma directa en la instauración de un correcto tratamiento para los pacientes. Son técnicas que pueden aplicarse directamente a la muestra clínica o a la colonia obtenida del cultivo. Numerosos artículos han revisado la situación actual de estas nuevas técnicas de diagnóstico molecular frente a otras técnicas de diagnóstico clásico<sup>15-17</sup>.

El empleo de técnicas moleculares sobre cepas obtenidas de un cultivo permite adelantar el diagnóstico de especie en algunos casos. Si bien las características morfológicas (micro y macroscópicas) permiten hacer una identificación preliminar del organismo causante, en muchas ocasiones la identificación de la especie definitiva requiere técnicas de PCR y secuenciación, ya que las características fenotípicas no siempre son suficientes para distinguir entre las diferentes especies<sup>18</sup>. Es importante realizar una correcta identificación de la especie, ya que se ha observado la existencia de especies crípticas de interés patológico que se aíslan cada vez con más frecuencia y cuya sensibilidad a los antifúngicos es, en algunos casos, diferente a la de otras especies morfológicamente idénticas o muy parecidas.

La realización de técnicas moleculares directamente sobre la muestra clínica puede permitir la obtención de un diagnóstico en cuestión de horas, frente a los días o semanas que se demora por los métodos convencionales (en caso de que se aísla la cepa) o que sea el único método (en el caso de hongos no viables). Sin embargo, a pesar de la gran expansión de estas técnicas, no se encuentran dentro de los criterios de diagnóstico de las enfermedades fúngicas definidos por la European Organization for Research and Treatment of Cancer/ Mycoses Study Group (EORTC/MSG), debido principalmente a su falta de estandarización<sup>19</sup>.

La comparación entre estudios es complicada, ya que las técnicas de extracción, regiones amplificadas, métodos de detección de la amplificación e incluso las muestras empleadas son diferentes. Sin embargo, la EAPCRI (European Aspergillus PCR Initiative) demostró que el factor que más afectaba a los resultados discordantes entre laboratorios era la extracción de ADN. Por ello, se han propuesto unos mé-

todos de extracción de ADN para sangre completa y suero que han permitido la obtención de resultados similares en diferentes laboratorios. Esto puede permitir que las técnicas moleculares se incluyan como criterio diagnóstico en las próximas guías de la EORTC/MSG. Sin embargo, aún no hay criterios estandarizados similares para el procesamiento de muestras respiratorias<sup>20</sup>.

En general, las técnicas de diagnóstico molecular de patología fúngica pueden seguir 2 abordajes diferentes. Los abordajes panfúngicos consisten en la amplificación y posterior secuenciación de regiones comunes a todos los hongos. La otra posibilidad se basa en la amplificación de regiones específicas del género o la especie que se busca.

La principal ventaja de los abordajes panfúngicos es su capacidad de detectar cualquier patógeno sin necesidad de tener una sospecha previa de cuál es el causante del cuadro. Las técnicas panfúngicas más empleadas consisten en la amplificación de regiones comunes a todos los hongos, seguida de la secuenciación que permite identificar el hongo causante. Estas técnicas son caseras, excepto una comercial llamada MycoReal Fungi (Ingenetix GMBH, Viena) de la que por el momento no hay estudios publicados. La principal desventaja es que la aplicación de estas técnicas en muestras respiratorias podría generar amplificación de especies de *Candida* que se encuentran en el tracto respiratorio sin causar patología. Además, en el caso de algunos géneros como *Aspergillus*, en ocasiones el poder de discriminar entre especies de estas técnicas no es suficiente y hay que recurrir a la amplificación de otras regiones que permiten una mejor diferenciación de especie.

En el caso de las técnicas que amplifican regiones específicas de algún género o especie en concreto, existen en el mercado algunas comerciales que —mediante técnicas de PCR a tiempo real— permiten identificar rápidamente el género causante del cuadro. La limitación de estas es que, pese a adelantar considerablemente el diagnóstico, la mayoría no proporciona una correcta identificación de especie, lo cual puede requerir la realización de otras técnicas. Además, en este caso los criterios para definir como positiva una PCR deben estar muy bien definidos, ya que la amplificación de algunos hongos que a menudo son colonizadores del tracto respiratorio no permite afirmar que se trate de una infección fúngica invasiva.

Estas técnicas comerciales se centran principalmente en la detección de especies de *Aspergillus*. Entre las que están validadas para su uso en muestras respiratorias cabe destacar: MycAssay *Aspergillus* (Microgen Bioproducts Ltd.) y *Aspergillus* spp. Q-PCR Alert (Nanogen), que dan una identificación a nivel de género; MycoReal *Aspergillus*, que permite la diferenciación de 5 especies de *Aspergillus* (si bien es posible que las especies crípticas sean identificadas incorrectamente), y AsperGenius (PathoNostics) y MycoGENIE *A. fumigatus* qPCR (Ademtech), que además de la detección de *Aspergillus* también son capaces de identificar algunas de las mutaciones de resistencia a triazoles más frecuentes. Todavía no hay estudios suficientes que permitan saber su verdadera utilidad.

Sin embargo, no hay que olvidar que otros hongos pueden ser causantes de patología respiratoria, por lo que, si hay sospecha de *Pneumocystis jirovecii*, *Histoplasma* spp., etc. habría que realizar PCR específicas para estos patógenos.

### Detección de virus

Los virus respiratorios son la causa más frecuente de infección del tracto respiratorio superior, pero también están implicados en cuadros más graves como bronquiolitis y neumonía<sup>21</sup>. Se han descrito más de 200 virus capaces de producir infección respiratoria. Los más frecuentes son: virus de la gripe A, virus de la gripe B, virus parainfluenza 1-4, virus respiratorio sincitial, metapneumovirus humano, enterovirus, rinovirus, coronavirus, poliomavirus WU y KI, bocavirus humano y adenovirus (tabla 1). Sin embargo, en determinados pacientes (fundamentalmente inmunodeprimidos) no hay que olvidar

otros virus asociados a infección respiratoria, como el virus de la varicela zóster, citomegalovirus, virus herpes simple, virus herpes 6 y 7, hantavirus, mimivirus y virus del sarampión<sup>22</sup>. Generalmente, un mismo cuadro respiratorio puede ser causado por virus diferentes, por lo que el diagnóstico etiológico definitivo deberá confirmarse mediante técnicas microbiológicas.

En comparación con las técnicas de diagnóstico clásicas, como el cultivo celular o la detección de antígeno, los métodos moleculares en sus múltiples variantes presentan mayor sensibilidad y especificidad, mayor rapidez en general, así como posibilidad de detectar varios virus simultáneamente, identificar nuevos virus y automatizar la técnica. La identificación rápida del virus causante de la infección permite instaurar un tratamiento adecuado y precoz, así como prevenir la transmisión y mejorar el control de brotes. Sin embargo, las técnicas moleculares también presentan una serie de inconvenientes: posibles inhibiciones; variabilidad de los virus que obliga a revisar periódicamente las dianas de cebadores y sondas; falsos positivos por la detección de virus que colonizan la mucosa respiratoria en personas asintomáticas, o virus no viables excretados de forma prolongada después de la resolución de la infección<sup>23,24</sup>.

La PCR es la técnica más empleada, tanto a tiempo final como a tiempo real<sup>25,26</sup>. La PCR a tiempo real presenta una mayor sensibilidad; hace posible la amplificación y detección simultánea del producto de PCR y permite la cuantificación del material genético en la muestra. Aunque por ahora la información acerca del significado de la carga viral es limitada, se ha visto que puede estar relacionada con la gravedad del paciente<sup>27</sup>, su evolución y respuesta al tratamiento<sup>28</sup>, y que incluso podría permitir diferenciar entre colonización e infección<sup>29</sup>.

Debido a la gran cantidad de virus diferentes que pueden estar involucrados en las infecciones respiratorias y la existencia de coinfecciones, es de gran importancia la utilización de técnicas que posibiliten la detección múltiple de un número considerable de virus en una única alícuota de muestra. Los métodos de PCR múltiple constituyen una herramienta muy útil con independencia del sistema empleado para detectar los productos de amplificación, ya sea mediante electroforesis en gel de agarosa, detección a tiempo real, espectrometría de masas o *arrays* de ADN.

En los últimos años, han surgido numerosas técnicas comerciales para la detección simultánea de múltiples virus respiratorios (tabla 2) que presentan la ventaja de ser muy rápidas (permitiendo obtener resultados incluso en menos de 1 h) y algunas totalmente automatizadas, en las que la extracción, la amplificación y la detección tienen lugar dentro del mismo equipo<sup>30,31</sup>. Además, algunas técnicas permiten la detección tanto de virus como de bacterias, algo fundamental en el caso del diagnóstico de la neumonía. Sin embargo, el inconveniente de estas nuevas técnicas es su elevado coste.

Los métodos moleculares permiten ir más allá de la identificación del virus responsable del cuadro, ya que la secuenciación del mismo ayuda a llevar a cabo su caracterización y genotipado, a realizar estudios de epidemiología molecular y a identificar resistencias a determinados antivirales<sup>32</sup>.

### **Impacto de las técnicas moleculares en el diagnóstico de las infecciones respiratorias**

En los últimos años se han realizado estudios sobre el impacto de las técnicas moleculares en el manejo y pronóstico de pacientes con infecciones respiratorias, así como de coste-efectividad de su implantación en los laboratorios de microbiología clínica. Rogers et al<sup>33</sup> publicaron un estudio evaluando el impacto de la incorporación de FilmArray Rapid Respiratory Panel (BioFire Diagnostics; Salt Lake City, Utah, Estados Unidos) en el pronóstico de niños ingresados por una infección respiratoria aguda. En el estudio se demostró que la implementación de esta técnica reducía de manera significativa la duración de la estancia hospitalaria, así como el tiempo del aislamiento y la duración del tratamiento antibiótico, siempre y cuando los resultados

estuviesen disponibles en las primeras 4 h. Hay que destacar que solo se tomaron en cuenta los resultados de la detección de virus respiratorios, ya que la detección de los 3 patógenos bacterianos incluidos en el panel (*M. pneumoniae*, *B. pertussis* y *C. pneumoniae*) no se había validado en el momento del estudio. En otro estudio publicado, los autores evaluaron el impacto de una técnica molecular, PCR-based Unyvero Pneumonia (Curetis AG, Holzgerlingen, Germany), en el manejo de los pacientes con neumonía nosocomial grave<sup>13</sup>. Esta técnica permite la identificación de 18 patógenos bacterianos y de *P. jirovecii*, junto con 22 marcadores de resistencia. El ensayo Unyvero Pneumonia no solo redujo el tiempo hasta la obtención del resultado en comparación con el cultivo convencional (4 frente a 48-96 h), sino que también detectó un número importante de infecciones múltiples (55,1 frente a 8,2%). En cuanto al impacto sobre el manejo de pacientes, el tratamiento empírico inicial fue cambiado en el 67,3% de los casos basándose en los resultados del ensayo, incluida la detección de los genes de resistencia.

El incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos aumenta la probabilidad de que los tratamientos empíricos habituales sean inefectivos, lo que produce un retraso en el inicio de un tratamiento antibiótico apropiado<sup>34</sup>. En los últimos años se han publicado numerosos estudios que demuestran que el retraso en establecer un tratamiento antibiótico apropiado aumenta la morbimortalidad de los pacientes con neumonía<sup>35,36</sup>, aunque, indirectamente, estos estudios confirman la importancia del diagnóstico microbiológico rápido que se puede proporcionar mediante técnicas moleculares y el impacto que dichas técnicas puede tener para el manejo adecuado de los pacientes, especialmente en la neumonía intrahospitalaria grave.

Otro aspecto que hay que tener en cuenta es la detección de múltiples patógenos. La frecuencia de infecciones mixtas detectadas ha crecido de manera notable con la implementación de las técnicas moleculares. Aunque se ha demostrado el impacto de la coinfección del virus de la gripe A (H1N1) y patógenos bacterianos (p. ej., *S. aureus* y *S. pneumoniae*) en la mortalidad<sup>37</sup>, el papel de las infecciones mixtas con otros virus respiratorios no está tan claro. En cuanto a la neumonía con más de un patógeno bacteriano detectado, se ha demostrado que la infección polimicrobiana es un factor de riesgo para el tratamiento empírico inapropiado, cuyas consecuencias ya se han discutido previamente<sup>38</sup>.

Aparte de las técnicas moleculares que permiten la detección cualitativa de los patógenos respiratorios, recientemente se han publicado estudios que resaltan la importancia de la cuantificación de ARN/ADN detectado, que permitiría la discriminación entre colonización frente a infección<sup>39</sup> o contaminación con flora del tracto respiratorio superior<sup>40</sup>.

Respecto a los estudios de coste-efectividad de las pruebas moleculares, Leone et al<sup>41</sup> evaluaron el impacto económico del uso de Cepheid Xpert real-time PCR (Cepheid; Sunnyvale, California, Estados Unidos) para el diagnóstico rápido de *S. aureus* resistente a la metilina (SARM) en las muestras respiratorias (lavado broncoalveolar [BAL] y mini-BAL) de los pacientes con sospecha de neumonía asociada a ventilación mecánica. Para ello, se consideraron 2 posibilidades de tratamiento antibiótico empírico: uno más caro (150 euros/día en pacientes con fallo renal) y otros más económicos (50 euros/día). El coste del test fue de 45 euros. Los autores demostraron que, en el caso del tratamiento empírico de 150 euros/día, la prueba era coste-efectiva independientemente de la prevalencia de SARM y que, en el caso del tratamiento de 50 euros/día, el test era coste-efectivo si la prevalencia era > 25%. En 2011, Harris et al<sup>42</sup> publicaron un estudio de coste-efectividad en el que compararon 33 diferentes estrategias para diagnosticar la neumonía por *P. jirovecii* en los pacientes positivos para el VIH en Sudáfrica. En este estudio se demostró que cualquiera de las técnicas moleculares evaluadas (PCR a tiempo final, PCR anidada, PCR a tiempo real) para la detección de *P. jirovecii* en una muestra respiratoria menos invasiva (esputo) representa una opción más coste-efectiva (26-51 dólares por año de vida ganado y con

una tasa de pacientes tratados con éxito de 77-90%) en comparación con otras estrategias diagnósticas evaluadas. Recientemente, Dugas et al<sup>43</sup> han publicado un análisis de coste-efectividad en el que se evalúan diferentes estrategias del manejo de los pacientes atendidos en el departamento de urgencias con una infección respiratoria aguda durante la temporada de gripe según su prevalencia. Durante las prevalencias más bajas de gripe (3-7%), la opción más coste-efectiva fue tratar a los pacientes según el resultado de una técnica rápida de PCR. Sin embargo, en prevalencias más altas (> 7%), la mejor estrategia era tratar a todos los pacientes. No obstante, esta última opción puede representar un factor de riesgo para el desarrollo de resistencias a los antivirales que debe evaluarse.

### Futuro de las técnicas moleculares en el laboratorio de microbiología clínica

Hoy en día ninguna técnica microbiológica está exenta de limitaciones, incluidos los métodos moleculares. Entre ellas hay que destacar una sensibilidad y una especificidad muy variables dependiendo de la técnica y el tipo de estudio, falta de estandarización, detección de microorganismos no viables o de ácidos nucleicos extracelulares, y escasos ensayos clínicos que demuestren su impacto sobre el pronóstico de pacientes con infecciones respiratorias. Por otra parte, muchas de las técnicas comerciales presentan unas ventajas importantes, en comparación sobre todo con el cultivo convencional: capacidad de detectar simultáneamente múltiples microorganismos y factores de resistencia, tiempos de respuesta de unas pocas horas, sistemas integrados que permiten la extracción y detección en la misma plataforma.

Actualmente, el principal obstáculo para la incorporación de la mayoría de estas técnicas a la rutina del laboratorio de microbiología clínica es el elevado coste y la necesidad de un equipamiento sofisticado. Debido a esto, en muchas ocasiones la aplicación de las técnicas moleculares, y sobre todo de los sistemas comerciales integrados, queda restringida a unos grupos concretos de pacientes (p. ej., enfermos críticos o inmunodeprimidos). En estos casos, las técnicas rápidas ofrecen un claro beneficio en cuanto al pronóstico de los pacientes y además suelen ser coste-efectivas. En cuanto a otros grupos de pacientes (neumonía comunitaria, infección respiratoria de vías altas, etc.), es necesario realizar más estudios para demostrar las ventajas de su implementación en el proceso diagnóstico.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

### Bibliografía

- Mortality and global health estimates [consultado 18-9-2015]. Geneva: World Health Organization; 2014. Disponible en: [http://www.who.int/gho/mortality\\_burden\\_disease/en/](http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/en/)
- Cilloniz C, Ewig S, Polverino E, Marcos MA, Esquinas C, Gabarrus A, et al. Microbial aetiology of community-acquired pneumonia and its relation to severity. *Thorax*. 2011;66:340-6.
- Estudio Nacional de Vigilancia de Infección Nosocomial en Servicios de Medicina Intensiva (Informe ENVIN-UCI 2011) [consultado 18-9-2015]. Disponible en: <http://hws.vhebron.net/envin-helics/Help/Informe%20ENVIN-UCI%202011.pdf>
- Enne VI, Personne Y, Grgic L, Gant V, Zumla A. Aetiology of hospital-acquired pneumonia and trends in antimicrobial resistance. *Curr Opin Pulm Med*. 2014;20:252-8.
- Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior. 2007 [consultado 18-9-2015]. Disponible en: <https://www.seimc.org/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientosmicrobiologia25.pdf>
- Zumla A, Al-Tawfiq JA, Enne VI, Kidd M, Drosten C, Breuer J, et al. Rapid point of care diagnostic tests for viral and bacterial respiratory tract infections—needs, advances, and future prospects. *Lancet Infect Dis*. 2014;14:1123-35.
- Cercenado E, Marin M, Burillo A, Martín-Rabadán P, Rivera M, Bouza E. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* in lower respiratory tract secretions from patients with suspected ventilator-associated pneumonia: evaluation of the Cepheid Xpert MRSA/SA SST1 assay. *J Clin Microbiol*. 2012;50:4095-7.
- De Paz HD, Brotons P, Muñoz-Almagro C. Molecular isothermal techniques for combating infectious diseases: towards low-cost point-of-care diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*. 2014;14:827-43.
- Petrone BL, Wolff BJ, DeLaney AA, Diaz MH, Winchell JM. Isothermal detection of *Mycoplasma pneumoniae* directly from respiratory clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 2015;53:2970-6.
- Wang Q, Zhou Y, Li S, Zhuo C, Xu S, Huang L, et al. Real-time fluorescence loop mediated isothermal amplification for the detection of *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One*. 2013;8:e66406.
- Zhang W, Chen C, Cui J, Bai W, Zhou J. Application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid diagnosis of pathogenic bacteria in clinical sputum specimens of acute exacerbation of COPD (AECOPD). *Int J Clin Exp Med*. 2015;8:7881-9.
- Tuite N, Reddington K, Barry T, Zumla A, Enne V. Rapid nucleic acid diagnostics for the detection of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria: is it time for a paradigm shift? *J Antimicrob Chemother*. 2014;69:1729-33.
- Jamal W, Al Roomi E, AbdulAziz LR, Rotimi VO. Evaluation of Curetis Unyvero, a multiplex PCR-based testing system, for rapid detection of bacteria and antibiotic resistance and impact of the assay on management of severe nosocomial pneumonia. *J Clin Microbiol*. 2014;52:2487-92.
- Lass-Flörl C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses*. 2009;52:197-205.
- Kozel TR, Wickes B. Fungal diagnostics. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4:a019299.
- Halliday CL, Kidd SE, Sorrell TC, Chen SC. Molecular diagnostic methods for invasive fungal disease: the horizon draws nearer? *Pathology*. 2015;47:257-69.
- Arvanitis M, Anagnostou T, Fuchs BB, Caliendo AM, Mylonakis E. Molecular and nonmolecular diagnostic methods for invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27:490-526.
- Unda F, Agüero J, Fariñas MC, Martínez-Martínez L. Identificación de hongos de importancia clínica mediante técnicas moleculares. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29:282-5.
- Ascioglu S, Rex JH, De Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis*. 2002;34:7-14.
- White PL, Wingard JR, Bretagne S, Löffler J, Patterson TF, Slavina MA, et al. *Aspergillus* polymerase chain reaction: systematic review of evidence for clinical use in comparison with antigen testing. *Clin Infect Dis*. 2015;61:1293-303.
- Dasaraju PV, Liu C. Infections of the respiratory system. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. Galveston: The University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
- Ruuskanen O, Lahti E, Jennings LC, Murdoch DR. Viral pneumonia. *Lancet*. 2011;377:1264-75.
- Vallières E, Renaud C. Clinical and economical impact of multiplex respiratory virus assays. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;76:255-61.
- Pozo F, Casas I, Ruiz G, Falcón A, Pérez-Breña P. Aplicación de los métodos moleculares al diagnóstico y el estudio epidemiológico de las infecciones respiratorias causadas por virus. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26 Suppl 9:15-25.
- Ieven M. Currently used nucleic acid amplification tests for the detection of viruses and atypicals in acute respiratory infections. *J Clin Virol*. 2007;40:259-76.
- Mahony JB. Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21:716-47.
- Ricart S, García-García JJ, Anton A, Pumarola T, Pons M, Muñoz-Almagro C, et al. Analysis of human metapneumovirus and human bocavirus viral load. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32:1032-4.
- Antón A, López-Iglesias AA, Tórtola T, Ruiz-Camps I, Abrisqueta P, Llopert L, et al. Selection and viral load kinetics of an oseltamivir-resistant pandemic influenza A (H1N1) virus in an immunocompromised patient during treatment with neuraminidase inhibitors. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;68:214-9.
- Jansen RR, Wieringa J, Koekkoek SM, Visser CE, Pajkrt D, Molenkamp R, et al. Frequent detection of respiratory viruses without symptoms: toward defining clinically relevant cutoff values. *J Clin Microbiol*. 2011;49:2631-6.
- Ruggiero P, McMillen T, Tang YW, Babady NE. Evaluation of the BioFire FilmArray respiratory panel and the GenMark eSensor respiratory viral panel on lower respiratory tract specimens. *J Clin Microbiol*. 2014;52:288-90.
- Salez N, Nougaière A, Ninove L, Zandotti C, De Lamballerie X, Charrel RN. Prospective and retrospective evaluation of the Cepheid Xpert(R) Flu/RSV XC assay for rapid detection of influenza A, influenza B, and respiratory syncytial virus. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015;81:256-8.
- Somerville LK, Ratnamohan VM, Dwyer DE, Kok J. Molecular diagnosis of respiratory viruses. *Pathology*. 2015;47:243-9.
- Rogers BB, Shankar P, Jerris RC, Kotzbauer D, Anderson EJ, Watson JR, et al. Impact of a rapid respiratory panel test on patient outcomes. *Arch Pathol Lab Med*. 2015;139:636-41.
- Torres A, Ferrer M, Badia JR. Treatment guidelines and outcomes of hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2010;51 Suppl 1:S48-53.
- Houck PM, Bratzler DW, Nsa W, Ma A, Bartlett JG. Timing of antibiotic administration and outcomes for Medicare patients hospitalized with community-acquired pneumonia. *Arch Intern Med*. 2004;164:637-44.
- Iregui M, Ward S, Sherman G, Fraser VJ, Kollef MH. Clinical importance of delays in the initiation of appropriate antibiotic treatment for ventilator-associated pneumonia. *Chest*. 2002;122:262-8.

37. Rice TW, Rubinson L, Uyeki TM, Vaughn FL, John BB, Miller RR 3rd, et al. Critical illness from 2009 pandemic influenza A virus and bacterial coinfection in the United States. *Crit Care Med.* 2012;40:1487-98.
38. Cilloniz C, Ewig S, Ferrer M, Polverino E, Gabarrus A, Puig de la Bellacasa J, et al. Community-acquired polymicrobial pneumonia in the intensive care unit: aetiology and prognosis. *Crit Care.* 2011;15:R209.
39. Maillet M, Maubon D, Brion JP, Francois P, Molina L, Stahl JP, et al. *Pneumocystis jirovecii* (Pj) quantitative PCR to differentiate Pj pneumonia from Pj colonization in immunocompromised patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;33:331-6.
40. Gadsby NJ, McHugh MP, Russell CD, Mark H, Conway Morris A, Laurenson IF, et al. Development of two real-time multiplex PCR assays for the detection and quantification of eight key bacterial pathogens in lower respiratory tract infections. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21:788.e1-13.
41. Leone M, Malavieille F, Papazian L, Meyssignac B, Cassir N, Textoris J, et al. Routine use of *Staphylococcus aureus* rapid diagnostic test in patients with suspected ventilator-associated pneumonia. *Crit Care.* 2013;17:R170.
42. Harris JR, Marston BJ, Sangrujee N, DuPlessis D, Park B. Cost-effectiveness analysis of diagnostic options for pneumocystis pneumonia (PCP). *PLoS One.* 2011;6:e23158.
43. Dugas AF, Coleman S, Gaydos CA, Rothman RE, Frick KD. Cost-utility of rapid polymerase chain reaction-based influenza testing for high-risk emergency department patients. *Ann Emerg Med.* 2013;62:80-8.
44. Torres A, Blasi F, Peetermans WE, Viegi G, Welte T. The aetiology and antibiotic management of community-acquired pneumonia in adults in Europe: a literature review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;33:1065-79.
45. Gutiérrez F, Masiá M, Rodríguez JC, Mirete C, Soldán B, Padilla S, et al. Epidemiology of community-acquired pneumonia in adult patients at the dawn of the 21st century: a prospective study on the Mediterranean coast of Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11:788-800.
46. Self WH, Williams DJ, Zhu Y, Ampofo K, Pavia AT, Chappell JD, et al. Respiratory viral detection in children and adults: comparing asymptomatic controls and patients with community-acquired pneumonia. *J Infect Dis.* 2016;213:584-91.
47. Esperatti M, Ferrer M, Theessen A, Liapikou A, Valencia M, Saucedo LM, et al. Nosocomial pneumonia in the intensive care unit acquired by mechanically ventilated versus nonventilated patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182:1533-9.
48. Luyt CE, Brechot N, Chastre J. What role do viruses play in nosocomial pneumonia? *Curr Opin Infect Dis.* 2014;27:194-9.
49. Chastre J, Fagon JY. Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:867-903.
50. Hong HL, Hong SB, Ko GB, Huh JW, Sung H, Do KH, et al. Viral infection is not uncommon in adult patients with severe hospital-acquired pneumonia. *PLoS One.* 2014;9:e95865.
51. Benito N, Moreno A, Miro JM, Torres A. Pulmonary infections in HIV-infected patients: an update in the 21st century. *Eur Respir J.* 2012;39:730-45.
52. Aguilar-Guisado M, Jimenez-Jambrina M, Espigado I, Rovira M, Martino R, Oriol A, et al. Pneumonia in allogeneic stem cell transplantation recipients: a multicenter prospective study. *Clin Transplant.* 2011;25:E629-38.
53. Alangaden GJ, Wahiduzzaman M, Chandrasekar PH. Aspergillosis: the most common community-acquired pneumonia with gram-negative bacilli as copathogens in stem cell transplant recipients with graft-versus-host disease. *Clin Infect Dis.* 2002;35:659-64.
54. Giannella M, Muñoz P, Alarcón JM, Mularoni A, Grossi P, Bouza E. Pneumonia in solid organ transplant recipients: a prospective multicenter study. *Transpl Infect Dis.* 2014;16:232-41.
55. Hwang SM, Lim MS, Han M, Hong YJ, Kim TS, Lee HR, et al. Comparison of xTAG respiratory virus panel and Verigene Respiratory Virus Plus for detecting influenza virus and respiratory syncytial virus. *J Clin Lab Anal.* 2015;29:116-21.
56. Salez N, Vabret A, Leruez-Ville M, Andreoletti L, Carrat F, Renois F, et al. Evaluation of four commercial multiplex molecular tests for the diagnosis of acute respiratory infections. *PLoS One.* 2015;10:e0130378.
57. Balada-Llasat JM, LaRue H, Kelly C, Rigali L, Pancholi P. Evaluation of commercial ResPlex II v2.0, MultiCode-PLx, and xTAG respiratory viral panels for the diagnosis of respiratory viral infections in adults. *J Clin Virol.* 2011;50:42-5.
58. García-Arroyo L, Prim N, Martí N, Roig MC, Navarro F, Rabella N. Benefits and drawbacks of molecular techniques for diagnosis of viral respiratory infections. Experience with two multiplex PCR assays. *J Med Virol.* 2016;88:45-50.
59. Kim HK, Oh SH, Yun KA, Sung H, Kim MN. Comparison of Anyplex II RV16 with the xTAG respiratory viral panel and Seeplex RV15 for detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol.* 2013;51:1137-41.