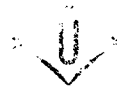


(043) "1997" Nog

1600136029 Y

UTILIDAD DE LA PCR EN EL DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO RUTINARIO DE LAS PATOLOGIAS INFECCIOSAS MAS FRECIENTES



de Lleida
Biblioteca

10 NOV. 1997

E: 6791

S:

Antonio Nogués Biau
Tesis Doctoral, 1997
Facultad de Medicina. Universidad de Lleida



Director

Enrique Herrero Perpiñán

Departamento de Ciencias Médicas Básicas.
Facultad de Medicina. Universidad de Lleida

(043)
"1997"

NOG

0118-03060

E) DISCUSION

La utilización de los métodos de amplificación de ácidos nucleicos para el diagnóstico de muchas enfermedades infecciosas ha venido siendo práctica común en los últimos años. La detección puntual de un determinado microorganismo mediante los protocolos estándar de PCR no suele ofrecer ningún obstáculo que no pueda ser superado fácilmente con los niveles actuales de desarrollo de la técnica. Sin embargo, la utilización rutinaria de la PCR en un laboratorio clínico para el diagnóstico de determinados síndromes tales como infecciones respiratorias o infecciones del SNC que pueden obedecer a múltiples etiologías, junto con la capacidad que debe tener la técnica para dar una respuesta adecuada en el tiempo a la demanda de detección de otros microorganismos implicados en otros tipos de infecciones (lo que constituye la práctica habitual en un laboratorio de diagnóstico microbiológico), obligan necesariamente a plantearse el diagnóstico por PCR mediante una estrategia que permita mantener los niveles de sensibilidad y especificidad de la técnica. La PCR debería ofrecer, además, sus resultados en un tiempo útil para el clínico.

La técnica de la PCR aplicada al diagnóstico de las enfermedades infecciosas implica la realización de una serie de pasos que consumen mucho tiempo, como son las técnicas de extracción y purificación de DNA o RNA de las muestras clínicas, el propio proceso de amplificación y las técnicas de detección e identificación del producto amplificado. Sin duda alguna, estos procedimientos lentos y trabajosos han contribuido a obstaculizar la aplicación general y rutinaria de las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos en los laboratorios clínicos. En los últimos años, sin embargo, se ha avanzado mucho en el tratamiento de todos estos problemas y, aunque todavía no se ha alcanzado el nivel deseado en todos los casos, el estado actual de desarrollo de las diferentes técnicas relacionadas con el diagnóstico por PCR permiten afrontar con optimismo su aplicación rutinaria al diagnóstico microbiológico. Las técnicas rápidas de extracción y purificación de DNA o RNA, los modernos termocicladores y las técnicas de hibridación en placa permiten actualmente la realización de un diagnóstico por PCR en 5-6 horas, lo que representa un notable avance sobre la metodología inicial de la PCR.

La introducción del diagnóstico por PCR en nuestro laboratorio se realizó en 1992. Inicialmente, su aplicación se limitó a una serie de patógenos muy concretos: *M. tuberculosis*, *Legionella*, *P. carinii*, *Toxoplasma* y citomegalovirus. La complejidad de la

técnica en aquellos momentos no nos hubiera permitido cubrir la demanda que habría generado su aplicación a otros microorganismos o patologías más frecuentes. Incluso en el caso de la tuberculosis, su diagnóstico por PCR quedaba relegado a aquellas situaciones con fuerte sospecha clínica o a la detección de *M. tuberculosis* en determinados tipos de muestras (generalmente obtenidas por técnicas invasivas).

En los últimos tres años la introducción de nuevos métodos en la estrategia de diagnóstico por PCR nos ha permitido abordar nuevos diagnósticos de patologías consideradas frecuentes en un medio hospitalario, sin colapsar la actividad de la unidad de PCRs y adelantando el tiempo de respuesta respecto de la mayor parte de métodos diagnósticos convencionales. Estos avances (que no son todavía definitivos y que indudablemente podrán ser mejorados en el futuro) inciden sobre todo en los métodos de extracción de ácidos nucleicos, siendo mucho más sencillos que los métodos clásicos, además de permitir el procesamiento simultáneo de varias muestras y sobre todo de reducir extraordinariamente el tiempo de preparación de la muestra (30-60 min frente a las 3-5 horas de los métodos clásicos). Por otra parte, la llegada al mercado de nuevas generaciones de termocicladores ha constituido también un notable progreso ya que permiten reducir el tiempo de los ciclos de amplificación de 5-6 horas a 1-2 horas. Como resultado de todo ello la técnica puede realizarse, desde el inicio del procesamiento de la muestra a la visualización final de los resultados por electroforesis, en tan sólo tres horas, o en seis horas si la identificación del producto amplificado se realiza por hibridación en placa.

Mediante el análisis y discusión de los resultados obtenidos en este estudio pretendemos demostrar que el diseño de una buena estrategia de diagnóstico por PCR permite no tan solo abordar aquellos microorganismos no detectables por los métodos convencionales sino también mejorar el resultado de éstos en muchas otras situaciones y sustituir con ventaja algunos métodos complejos en los laboratorios clínicos. Todo ello es posible realizarlo sin romper la rutina del trabajo en el laboratorio y dando respuestas diariamente a todas las demandas de diagnóstico por PCR incluidas en nuestros protocolos.

En los últimos años han aparecido en el mercado algunas técnicas de diagnóstico microbiológico por PCR. Estas técnicas aportan una buena estandarización del método, idéntica para todos los laboratorios que las utilizan, y unos resultados comparables y reproducibles entre los diferentes centros. Sin embargo, no pretendemos en nuestro estudio evaluar las mismas. La utilidad de la PCR que nosotros queremos resaltar es la de la técnica convencional, no comercializada, estandarizada en el propio laboratorio y que aporta a éste una capacidad diagnóstica prácticamente ilimitada. Probablemente en algunos tipos de diagnósticos será conveniente o habrá razones para acudir a la realización de alguna técnica comercializada, pero la base del diagnóstico por PCR en un laboratorio clínico ha de ser, según nuestro criterio, la técnica no comercial mediante la cual el laboratorio mejora y amplía su capacidad diagnóstica.

1. ANÁLISIS DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.-

La extracción y purificación de DNA o RNA de los microorganismos presentes en las muestras clínicas sometidas a estudio es un paso primordial de gran importancia en el diagnóstico por técnicas de amplificación. La elección del método adecuado en cada momento depende del tipo de muestra que se vaya a analizar y de los microorganismos que se pretenda detectar en la misma. Es sabido que muchas muestras clínicas contienen una gran cantidad de inhibidores del proceso de amplificación que pueden afectar seriamente al diagnóstico por PCR, incrementando la proporción de falsos negativos. Maas *et al.* (1994) encontraron diferencias importantes en la sensibilidad de la PCR dependiendo de los diferentes métodos utilizados para la preparación de la muestra. Esto implica que el método elegido debe garantizar la separación de las sustancias inhibidoras respecto del DNA extraído. La presencia de estas sustancias puede detectarse fácilmente mediante el procesamiento en paralelo de un control positivo mezclado con parte de la muestra, lo que nos da información sobre el grado de purificación de los ácidos nucleicos obtenidos con el método de extracción (Zazzi *et al.*, 1992). La utilidad clínica de la PCR en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas puede verse notablemente mejorada

documentando el nivel de fiabilidad no sólo de los resultados positivos sino también de los negativos (Cone *et al.*, 1992).

En las páginas siguientes valoraremos los diferentes métodos de extracción y purificación de DNA que hemos utilizado a lo largo de este estudio, resaltando las ventajas e inconvenientes de cada uno de ellos.

1.1 Utilización de ultrasonidos.

Constituye una forma mecánica de lisis que permite romper las paredes celulares sin introducir agentes inhibidores externos. Ehrlich *et al.* (1994) han utilizado con éxito este método en el procesamiento de algunas muestras clínicas. Nosotros lo hemos utilizado desde el principio de nuestro estudio, pero aplicándolo solamente a la preparación de los controles positivos. La sonicación de suspensiones bacterianas permite extraer el DNA de una forma rápida y eficaz. La aplicación de este método sobre muestras clínicas simuladas (fundamentalmente secreciones respiratorias) nos ofreció resultados peores que otros métodos de extracción, por lo que no lo hemos utilizado en la preparación de muestras clínicas.

1.2. Extracción con fenol-cloroformo.

Es el método de extracción y purificación de DNA mas comúnmente usado para la práctica de la mayor parte de técnicas moleculares (Sambrook *et al.*, 1989). Con la utilización de este método hemos obtenido los mejores resultados de sensibilidad de la PCR sobre cualquier tipo de muestra clínica. Su realización comporta la utilización de algunos reactivos tales como EDTA, SDS o sustancias caotrópicas que pueden ser, en determinadas proporciones, inhibidores de los enzimas de amplificación. Esto requiere en primer lugar ajustar bien las proporciones y realizar pasos ulteriores para eliminar o neutralizar tales sustancias (Persing *et al.*, 1993). El porcentaje de inhibiciones de la PCR que hemos detectado en aquellos casos en que se utilizó este método de extracción está alrededor del 3%, lo que puede ser una cifra bastante aceptable, ya que con toda seguridad no todos los casos de inhibición son imputables al método de extracción. Por lo que respecta al número mínimo de microorganismos detectable por PCR en las

condiciones anteriores, fue de alrededor de 25 UFC para *M. tuberculosis* sobre secreciones respiratorias y de 5-15 UFC para otros microorganismos, lo que representa, como veremos, una mayor sensibilidad que la conseguida por otros métodos.

El principal inconveniente de la extracción y purificación con fenol-cloroformo es el tiempo requerido en todo el proceso y la dificultad que conlleva el procesamiento de varias muestras a la vez. En este sentido, no consideramos este método adecuado para dar una buena respuesta a la presión diagnóstica asistencial en un laboratorio de Microbiología. Su utilidad podría quedar relegada a determinados casos puntuales en los que se sospeche una carga microbiana baja en alguna muestra clínica y se requiera al mismo tiempo un nivel de sensibilidad elevado.

1.3. Extracción mediante técnicas rápidas.

La capacidad del DNA para unirse al sílice o a partículas de cristal en presencia de agentes caotrópicos está ampliamente descrita en la literatura (Vogelstein *et al.*, 1979; Yang *et al.*, 1979; Marko *et al.*, 1989). Esta propiedad se ha utilizado como base para el desarrollo de los métodos rápidos de extracción y purificación de ácidos nucleicos. Boom *et al.* (1990) aplicaron por primera vez sobre muestras clínicas un método de estas características fácilmente estandarizable, sensible, reproducible, rápido y simple. En los últimos años han aparecido comercializados algunos métodos de extracción que incorporan pequeñas modificaciones sobre el descrito inicialmente por los citados autores.

Los métodos rápidos que hemos utilizado en este trabajo y que han sido expuestos anteriormente en esta Memoria cubren el objetivo de poder procesar varias muestras al mismo tiempo sin riesgo de contaminación cruzada de una muestra a otra, y acortan extraordinariamente el tiempo de procesamiento de las mismas (20-30 min frente a 3-5 horas de los métodos clásicos que utilizan fenol-cloroformo). Esto los convierte en métodos muy adecuados a las necesidades diagnósticas del laboratorio clínico. Por otra parte, el grado de purificación de los ácidos nucleicos es superior al obtenido por los métodos clásicos, disminuyendo el porcentaje de inhibiciones enzimáticas a menos del 1%.

El nivel de sensibilidad de la PCR practicada sobre ácidos nucleicos extraídos y purificados por estos métodos es inferior, en nuestra experiencia, al obtenido por los métodos clásicos (alrededor de 50 UFC para *M. tuberculosis* y de 25 UFC para otros microorganismos). Con todo, el nivel de sensibilidad de los métodos rápidos es suficiente para el diagnóstico clínico, ya que el inóculo microbiano presente en una muestra (si ésta es realmente representativa del foco infeccioso) suele ser mucho más elevado. Esto hace que, si comparamos en su conjunto las ventajas y los inconvenientes de uno u otro método, las técnicas rápidas resulten ser mucho más apropiadas para la práctica rutinaria de la PCR.

2. UTILIDAD DE LA PCR EN EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS.-

La incidencia de la infección pulmonar en la comunidad se sitúa alrededor del 1% (Foy *et al.*, 1979; Woodhead *et al.*, 1987; Aguirre *et al.*, 1993; Almirall *et al.*, 1993) y continúa siendo la mayor causa de hospitalización, una de las complicaciones más frecuentes y graves de la hospitalización y una causa común de muerte tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo (Musher *et al.*, 1996). Muchos de los microorganismos implicados en las infecciones de las vías respiratorias bajas no son abordados por las técnicas microbiológicas convencionales, por lo que las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos constituyen una herramienta muy útil no sólo por la capacidad de detección de cualquier microorganismo sino también porque sus resultados no se ven afectados por tratamientos antibióticos previos y porque estos resultados pueden ser aportados en un período de tiempo útil para el clínico.

En nuestro estudio hemos incluido en el diagnóstico por PCR los tres microorganismos más frecuentemente implicados en infecciones pulmonares: *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae*. Ocasionalmente, y siempre bajo indicación del clínico, se incluyó *Legionella pneumophila* entre los microorganismos a detectar por PCR. El tipo de muestra utilizado en casi la totalidad de los casos fue la PTA por el hecho de que los resultados obtenidos

a partir de ella son representativos del foco infeccioso y no presentan problemas de interpretación.

De los 86 casos en los que se aplicó simultáneamente la PCR para la detección de los tres microorganismos incluidos en el protocolo, 64 presentaban infección por alguno de estos tres gérmenes. La PCR permitió establecer el diagnóstico en 37 casos (57,8%). Los 27 restantes (42,2%) no fueron diagnosticados por PCR, lo que plantea la pregunta de cómo una técnica que se muestra tan sensible incluso sobre muestras equivalentes a las utilizadas en nuestro estudio inoculadas experimentalmente puede dejar sin diagnóstico un grupo de pacientes tan amplio. Es sabido que la PCR puede dar resultados falsos negativos: conocemos los problemas de inhibición enzimática que pueden ocasionar algunas sustancias presentes en muchas muestras clínicas y sabemos también de los fallos de amplificación que pueden producirse por problemas intermitentes debidos a complicaciones durante los primeros ciclos de la amplificación (Smith *et al.*, 1990), pero todos estos hechos difícilmente explican un número de falsos negativos tan elevado. Las técnicas de purificación de ácidos nucleicos utilizadas en nuestro estudio, así como el procesamiento en paralelo de controles positivos y la utilización en muchos casos de controles internos sobre las propias muestras clínicas, nos inclinan a pensar que los falsos negativos imputables a la técnica en sí probablemente sea un número muy reducido. Evaluar la sensibilidad clínica de cualquier técnica microbiológica es complicado si no se tiene en cuenta la calidad de la muestra. La muestra representativa del foco infeccioso y que contiene el microorganismo no siempre resulta fácil de obtener. La PTA, que es el tipo de muestra que mayormente hemos utilizado en este estudio para el diagnóstico de las infecciones pulmonares, es aceptada como de muy buena calidad, pero debe practicarse sólo en aquellos casos en que el infiltrado pulmonar es denso y periférico y no es tan útil en infiltrados intersticiales. Por otra parte, cuando la técnica se realiza sin control radioscópico o ecográfico (como ha sido en nuestro estudio) la sensibilidad de la muestra puede verse muy disminuida (Zabala *et al.*, 1981; Dorca, 1988). Sin duda alguna, el establecimiento de unos criterios adecuados para la obtención de una muestra representativa puede contribuir en gran medida a mejorar la sensibilidad clínica de las técnicas de amplificación en infecciones respiratorias.

El análisis de nuestros resultados por PCR para el diagnóstico de las infecciones neumocócicas demuestra que esta técnica es superior al cultivo convencional, probablemente debido a que éste se ve afectado de forma adversa por los tratamientos antibióticos previos. De los 30 casos constatados clínicamente de infección pulmonar por neumococo, la PCR detectó 20 (66,6%) mientras que el cultivo sobre las mismas muestras detectó 9 (30%). Esta mayor sensibilidad de la PCR justifica su inclusión en un diseño de diagnóstico de la infección pulmonar por técnicas de amplificación a pesar de que el neumococo puede ser detectado por los métodos convencionales, en principio menos complejos en su ejecución y más económicos. Por otra parte, la etiología neumocócica de la neumonía de adquisición comunitaria es la más frecuente, por lo que la aplicación de técnicas diagnósticas sofisticadas para su diagnóstico debe ser considerada favorablemente. No son, sin embargo, muy abundantes en la literatura los estudios que describen la aplicación de la PCR para el diagnóstico de la neumonía neumocócica. Algunos estudios intentan evaluar la PCR en las neumonías bacteriémicas aplicando la técnica sobre suero o sangre total (Salo *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1995), o sobre cultivos de sangre donde se demuestra un incremento en la detección de neumococo con respecto al cultivo (Hassan-King *et al.*, 1994, 1996). Gillespie *et al.* (1994) diseñaron un protocolo de PCR para la detección de neumococo sobre muestras de esputo, introduciendo en la serie experimental 30 casos de pacientes con neumonía en los cuales el cultivo permitió detectar la presencia del germen en 14 pacientes y la PCR y la detección de antígeno polisacárido en 13. Posiblemente, la dudosa representatividad del neumococo en el esputo, ya que puede encontrarse en el 25-50% de la población preescolar y en 18% de la población adulta sana (Joklik *et al.*, 1994), junto con el hecho de que las neumonías bacteriémicas alcanzan sólo el 25-30%, no favorece la aplicación de una técnica compleja sobre unas muestras cuyos resultados pueden presentar problemas de interpretación o serán positivos en contadas ocasiones. Por eso la utilización de métodos invasivos como la PTA, que con las técnicas modernas no suele provocar efectos secundarios importantes en el paciente, cada vez se hace más usual y es sobre este tipo de muestras que nosotros creemos deben ser aplicadas las técnicas de amplificación para la detección de neumococo.

Respecto de los otros agentes bacterianos (*C. pneumoniae* y *M. pneumoniae*) incluidos en nuestro diseño de PCRs para el diagnóstico de la infección pulmonar, los criterios de su inclusión son mucho más claros no sólo por la frecuencia de su implicación etiológica sino también por el hecho de que no se aíslan en los medios de cultivo convencionales. Aunque dichos agentes sí pueden aislarse en medios especiales, la aparición de los resultados puede demorarse 2-3 semanas, por lo que su utilidad no se ajusta a las necesidades del clínico.

M. pneumoniae aparece en nuestro estudio como el segundo agente causal en orden de frecuencia de la neumonía adquirida en la comunidad. Su detección en frotis faríngeos o esputos, sin embargo, no es suficiente para relacionar su presencia con un proceso de infección pulmonar de esta etiología y se requiere su confirmación verificando una respuesta serológica que demuestre que la infección es actual y no el resultado de un estado de portador a causa de infecciones previas (Marmion *et al.*, 1993). Los resultados de la PCR en nuestro estudio corresponden a muestras obtenidas por PTA, por lo que no plantean problemas de interpretación al ser representativas del foco infeccioso. El estudio serológico sobre dos muestras de suero reveló el diagnóstico de infección pulmonar por *M. pneumoniae* en 20 pacientes. En dos ocasiones el diagnóstico pudo realizarse a partir de los resultados de la primera muestra de suero (títulos superiores a 1/512) mientras que en el resto se hizo por detección de un incremento del título de cuatro veces entre la primera y segunda muestra. De estos 20 pacientes con infección pulmonar por *M. pneumoniae*, la PCR aportó el diagnóstico en nueve casos (45%), siendo negativa en los once restantes (55%). Esta diferencia de sensibilidad respecto a la obtenida por la misma técnica en el caso del neumococo podría explicarse por las diferentes características de presentación de la neumonía entre los dos gérmenes. La infección por *M. pneumoniae* suele dar con mayor frecuencia una afectación intersticial, situación que no es la más adecuada para la obtención de buenos resultados con la práctica de la PTA. En efecto, de los 20 pacientes con infección por *M. pneumoniae*, 12 de ellos presentaban signos radiológicos de consolidación y el resto signos de diseminación intersticial.

La serología, que tradicionalmente ha sido la técnica más utilizada para el diagnóstico de la neumonía por *M. pneumoniae*, ofrece una buena sensibilidad pero sus

resultados sólo sirven, en la mayor parte de los casos, para hacer un diagnóstico retrospectivo que no puede influir en la toma de decisiones terapéuticas por parte del clínico. Tan sólo en dos pacientes (de un total de 20) de nuestro estudio se obtuvieron títulos altos de anticuerpos en la primera muestra de suero. La PCR, en cambio, puede aportar el diagnóstico en menos de 24 horas, hecho que la convierte, en nuestra opinión, en la técnica de elección para la detección de las infecciones pulmonares por *M. pneumoniae*.

Algunos autores, utilizando la PCR sobre muestras respiratorias de vías altas (frotis faríngeos o aspirados nasofaríngeos), han encontrado una sensibilidad en comparación con las pruebas serológicas del 60% (Jeroen *et al.*, 1994), 83% (Williamson *et al.*, 1992) o resultados superiores a la serología (Blackmore *et al.*, 1995), si bien en este último caso el 56% de los pacientes fueron estudiados en una única muestra de suero. Todos estos autores señalan la importancia de la PCR en el diagnóstico de la infección pulmonar por *M. pneumoniae*, pero detectan en el tipo de muestras utilizadas por ellos la presencia de portadores sanos, con lo que aconsejan utilizar la PCR en combinación con el estudio serológico para una correcta interpretación de sus resultados.

Una vez más, todo lo anterior pone de manifiesto la importancia de la obtención de una muestra representativa del foco infeccioso. En nuestro caso, los resultados obtenidos por PCR no presentan dudas de interpretación y pueden ser utilizados de forma fiable en el manejo del paciente. El uso complementario de la serología servirá aquí para diagnosticar, aunque sea de forma retrospectiva, aquellos casos no detectados por PCR, bien sea por fallos de la técnica o por falta de calidad de la muestra.

El tercer microorganismo incluido en nuestro estudio de las infecciones respiratorias por PCR es *Chlamydia pneumoniae*. En nuestro medio posee una incidencia del 12% de todas las neumonías adquiridas en la comunidad. El estudio serológico de los pacientes (dos muestras de suero en paralelo) aportó el diagnóstico de neumonía por *C. pneumoniae* en 14 casos. De estos, 8 (57%) fueron diagnosticados también por PCR sobre muestras obtenidas por PTA mientras que en los seis restantes (42%) los resultados fueron negativos. El papel patógeno de *C. pneumoniae* ha sido documentado en los últimos años y las técnicas habituales para su diagnóstico han sido

las serológicas. Los cultivos celulares para el aislamiento de *C. pneumoniae* no tienen una sensibilidad elevada y requieren tiempo para ofrecer resultados positivos. Es por estos motivos que la PCR aparece como una técnica adecuada para suplir las deficiencias de las técnicas convencionales. Aunque existen varios estudios que demuestran que la PCR es útil para la detección de *C. pneumoniae* (Campbell *et al.*, 1992; Gaydos *et al.*, 1992, 1993; Ouchi *et al.*, 1994; Maass *et al.*, 1994; Yamada *et al.*, 1995; Ramírez *et al.*, 1996), sin embargo todos estos estudios no determinan la sensibilidad clínica de la PCR estudiando series amplias de pacientes con infección demostrada por este microorganismo. De hecho, es difícil la evaluación de la técnica ya que no se dispone de un método de referencia claro que pueda ser utilizado como estándar fiable. El intento más sólido de evaluación de la técnica fue realizado por Gaydos *et al.* (1994), utilizando como referencia patrón los resultados positivos obtenidos por dos o más técnicas (cultivo celular, PCR, inmunofluorescencia directa y serología). En estas condiciones, la sensibilidad de la PCR para el diagnóstico clínico de la infección por *C. pneumoniae* fue del 76,5% con una especificidad del 99%.

Hay concordancia en la mayor parte de estudios publicados en que la PCR detecta entre un 10-20% más casos que el cultivo y en que la serología (sólo si se aplica sobre dos muestras) detecta a su vez entre un 10-20% de casos más que la PCR (Ieven *et al.*, 1997). Según esto, parece claro que las técnicas de amplificación han de considerarse de elección en el diagnóstico de la infección por *C. pneumoniae* tanto por su aceptable grado de sensibilidad como por la rapidez de obtención de sus resultados.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio refuerzan también este planteamiento a la vez que plantean la necesidad de determinar en el futuro cuáles deben ser las muestras de elección para la detección de *C. pneumoniae*. Las técnicas invasivas utilizadas por nosotros tales como la PTA ofrecen buenos (aunque no óptimos) resultados, y sería interesante comprobar la sensibilidad y especificidad de otras muestras, como las de vías respiratorias altas o la utilización paralela de varios tipos de muestras, con la finalidad de mejorar las posibilidades de detección del microorganismo en aquellos casos de infección pulmonar.

Con el ánimo de facilitar la estrategia del laboratorio en el diagnóstico de las infecciones respiratorias hemos probado la utilización simultánea de los tres juegos de cebadores en una técnica de PCR múltiple con resultados excelentes sobre muestras inoculadas experimentalmente. Esta posibilidad simplificaría notablemente el trabajo de laboratorio, aunque evidentemente se requieren estudios complementarios para demostrar que la sensibilidad y especificidad se mantienen en los mismos niveles conseguidos en nuestro estudio.

Para completar el espectro de microorganismos incluidos en nuestro panel de diagnóstico de infecciones respiratorias por PCR analizaremos los resultados para detección de *L. pneumophila*. En nuestro medio, la infección pulmonar por *L. pneumophila* no es muy frecuente, con una incidencia inferior al 1% del total de neumonías de adquisición comunitaria. Este hecho nos ha llevado a no incluir rutinariamente las pruebas de detección de *L. pneumophila* en el diagnóstico etiológico de la infección respiratoria, aplicándola sólo cuando se nos sugiere por parte del clínico. En tres ocasiones se detectó esta especie por PCR (en muestras de esputo), siendo los cultivos sobre las mismas muestras negativos, así como la serología correspondiente a una única extracción de suero. Los resultados sobre un número tan corto de muestras no permiten extraer demasiadas conclusiones, pero sí apuntan la utilidad de la PCR en el diagnóstico de las infecciones por *L. pneumophila* en base a la rapidez de obtención de sus resultados, muy superior a la obtenida mediante cultivo microbiológico (3-5 días) o mediante serología.

3. UTILIDAD DE LA PCR EN EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LA INFECCIÓN TUBERCULOSA.-

Las técnicas de amplificación para el diagnóstico de la tuberculosis han sido acogidas con interés debido fundamentalmente a la necesidad existente de acortar el tiempo de identificación del microorganismo sin tener que esperar a los resultados del cultivo. Prueba de ello es la gran cantidad de estudios publicados, señalados en el

apartado de Introducción, evaluando la utilidad de estas técnicas en el diagnóstico de la tuberculosis.

Para evaluar en nuestro estudio la rentabilidad de las técnicas de amplificación en el diagnóstico de la tuberculosis hemos utilizado solamente aquellas muestras que fueron procesadas paralelamente por cultivo en medio de Lowenstein y PCR de la misma muestra, considerando pacientes con infección tuberculosa a aquellos en los que una u otra técnica ofrecía resultados positivos y al mismo tiempo fueron diagnosticados clínicamente como pacientes tuberculosos y tratados con tuberculostáticos durante al menos tres meses. Bajo estas premisas fueron catalogados como pacientes con infección tuberculosa 70, de los cuales la PCR detectó 63 (90%) y el cultivo 56 (80%). En muestras respiratorias el cultivo detectó 39 casos de infección (100%) y la PCR 37 (94,8%), mientras que en otro tipo de muestras (aspirados gástricos de pacientes pediátricos, médula ósea, PTA, orina y exudados) la PCR se mostró superior al cultivo, aunque el pequeño número de tales muestras no es suficiente para que sus resultados sean estadísticamente significativos. La especificidad de los resultados discordantes de la PCR con el cultivo (8 casos de PCR positiva y cultivo negativo) se evaluaron en base a los datos clínicos como se ha indicado anteriormente. Hubo, además, siete casos en los que el cultivo fue positivo y la PCR negativa.

El análisis de los resultados obtenidos por otros autores es muy parecido al descrito aquí. Así, Brisson *et al.* (1991) obtuvieron una sensibilidad del 97,4% y Schluger *et al.* (1994) del 87,5%; Bennedsen *et al.* (1996), en pacientes con tinción y cultivo positivo obtuvieron una sensibilidad del 91,4% y en pacientes con tinción negativa y cultivo positivo del 62%. Por otra parte, Maher *et al.* (1996) y Dilworth *et al.* (1996), sobre muestras de esputo, reportaron una sensibilidad del 91% y 92% respectivamente. La diferencias en cuanto a la sensibilidad diagnóstica de la técnica entre estos autores son difíciles de evaluar puesto que en cada caso se utilizan diferentes metodologías que afectan no tan solo al proceso de preparación de las muestras sino también a los métodos de detección del producto amplificado y, en algunos casos, a la utilización de cebadores diferentes. Con todo, y a pesar de las diferentes metodologías usadas, el grado de sensibilidad no difiere notablemente y está situado alrededor del 90%.

La aparición, en los últimos años, de algunas técnicas comercializadas permite la consecución de resultados más homogéneos entre los diferentes centros, pero no es objeto de nuestro estudio evaluar estas técnicas ni hacer referencia a los numerosos estudios de evaluación que existen en la literatura. Todos nuestros datos están basados en la aplicación de una PCR convencional no comercializada y descrita en esta Memoria. Estos resultados nos permiten confirmar la utilidad de la PCR en el diagnóstico de la tuberculosis, si bien, por el momento, no como una técnica única sino complementaria a los métodos microbiológicos habituales para la detección de micobacterias.

4. UTILIDAD DE LA PCR EN EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LAS INFECCIONES BACTERIANAS DEL SNC.-

De los 48 LCRs procesados en paralelo por PCR y cultivo convencional, aquella dio 41 resultados positivos y el cultivo 30. Si asumimos que el diagnóstico clínico de meningitis bacteriana es correcto en un 95% de los casos, esta prevalencia de la enfermedad nos daría una sensibilidad para el diagnóstico de la PCR del 91,1% mientras que el cultivo aporta una sensibilidad del 65,7%. Los mejores resultados aparecen en las meningitis meningocócicas, cuyo diagnóstico se ve mejorado un 22,6% si lo comparamos con los datos aportados por el cultivo. La labilidad del germen y su sensibilidad a los tratamientos antibióticos previos que afectan notablemente al cultivo pueden ser un factor determinante en la mejor sensibilidad de la PCR. Por otra parte, las características de un laboratorio que no ofrezca una actividad microbiológica continuada las 24 horas del día puede causar una disminución importante de la sensibilidad de los cultivos. La introducción de una técnica como la PCR que no se ve influenciada en su sensibilidad por todos estos factores constituye un elemento importante en el mantenimiento del nivel de eficacia diagnóstica en meningitis bacterianas. En el caso de las meningitis neumocócicas, también la PCR confiere resultados superiores a los del cultivo (siete diagnósticos por PCR frente a tres por cultivo convencional). Cabe destacar, además, que todas las discrepancias entre las dos técnicas han sido PCR positiva-cultivo negativo. En ningún caso de aislamiento del germen por cultivo se ha producido un resultado negativo por PCR.

Los límites más bajos de detección de neumococo y meningococo mediante las técnicas de amplificación utilizadas en nuestro estudio oscilaron entre 15 y 50 UFC. Esto confirma la PCR como un instrumento poderoso para el diagnóstico de aquellas infecciones con escaso número de gérmenes en el LCR. Así parecen sugerirlo en nuestra serie los tres casos de sepsis meningocócica con tinción de Gram y cultivo del LCR negativos en los que la PCR sobre la misma muestra fue positiva además de aislarse el meningococo en el hemocultivo.

Por otra parte, la rapidez de obtención de resultados mediante la PCR (seis horas incluyendo la identificación del producto amplificado por sondas de hibridación) constituye un importante argumento para su introducción sistemática en el diagnóstico de las meningitis bacterianas dada la urgencia terapéutica de estas situaciones clínicas o la importancia de un cambio a tiempo del tratamiento, orientado al agente causal.

Nuestros resultados son similares a los publicados por otros autores en parecidos estudios. Knight *et al.* (1992), utilizando cebadores específicos para *N. meningitidis* sobre una serie de 54 LCRs de pacientes con enfermedad meningocócica y pacientes control, encontraron una sensibilidad de la PCR del 91% la cual no se veía afectada por tratamientos previos. Ketel *et al.* (1990), en un estudio para detección por PCR de *H. influenzae* en LCR, consiguieron el diagnóstico en 39 de 40 casos de meningitis por *H. influenzae* (97,5%). Finalmente, Radstrom *et al.* (1994), en una estrategia de detección simultánea de *N. meningitidis*, *H. influenzae* y *S. agalactiae* muy similar a la que nosotros hemos utilizado en nuestro estudio, consiguieron el diagnóstico en 117 pacientes de los 125 estudiados (93,6%).

Nuestros resultados, junto a los de otros autores, confirman la utilidad y la eficacia de la PCR en el diagnóstico de la meningitis bacteriana, por lo que creemos que esta técnica debe ser incorporada a los métodos diagnósticos rutinarios de los laboratorios de Microbiología.

5. UTILIDAD DE LA PCR EN EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LAS INFECCIONES EN INMUNODEPRIMIDOS.-

Las infecciones por *P. carinii* y las reactivaciones de infecciones latentes por *Toxoplasma* y citomegalovirus son frecuentes en los enfermos inmunodeprimidos. Algunos de los métodos clásicos comúnmente utilizados para el diagnóstico de este tipo de infecciones, como los estudios serológicos, no son útiles en estos casos dada la escasa respuesta inmunológica de dichos pacientes. Es por ello que la utilización de técnicas de detección directa o de aislamiento del agente causal son preceptivas para su correcto diagnóstico. Los cultivos celulares aptos para el aislamiento de *T. gondii* y citomegalovirus son lentos en la obtención de resultados mientras que en el caso de *P. carinii* no existen. Por otra parte, los métodos convencionales de detección directa (tinciones o técnicas de inmunofluorescencia) presentan fallos de sensibilidad. Esto ha llevado a que las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos se hayan prodigado en los últimos años, como lo demuestran los numerosos estudios aparecidos en la literatura con la finalidad de suplir las deficiencias de los métodos convencionales en el diagnóstico de las infecciones por este tipo de gérmenes.

En nuestro estudio hemos utilizado la PCR en el diagnóstico de las infecciones por *P. carinii* comparando inicialmente sus resultados con los obtenidos por la tinción con metenamina de plata. Sobre 29 pacientes con manifestaciones clínicas compatibles con infección pulmonar por *P. carinii* la PCR fue positiva en 20 casos y la tinción en 12. Es difícil establecer la sensibilidad clínica de la PCR en estas situaciones, dado que no se dispone de una técnica que pueda ser utilizada como patrón estándar. Como contrapartida, sí se puede establecer la correlación de un resultado positivo por PCR y la existencia o no de enfermedad en base a las manifestaciones clínicas en pacientes inmunodeprimidos (Weig *et al.*, 1997), lo que nos daría una información importante acerca del valor predictivo de la técnica. De los 65 resultados positivos, 19 corresponden a muestras obtenidas por técnicas invasivas consideradas como las de elección para la correcta correlación de sus resultados con la infección clínica en el paciente (Tamburrini *et al.*, 1993). El resto de resultados positivos (46 esputos) se correlacionaron con infección del paciente clínicamente demostrada en 45 casos (97,8%), mientras que en un

caso la detección de *P. carinii* no pudo correlacionarse con enfermedad actual del paciente. Unos meses antes este paciente había sido diagnosticado de neumonía por *P. carinii* y recibió tratamiento por esta causa.

Los resultados obtenidos por la PCR en comparación con la tinción de plata demuestran que aquella detecta un 40% más de casos de presencia de *P. carinii* que la tinción. En un estudio reciente realizado por Weig *et al.* (1997), se refiere que la PCR mejora los resultados de la tinción de plata en un 63%. Otros autores resaltan también la superioridad de la PCR sobre los métodos convencionales en la detección de *P. carinii* (Cartwright *et al.*, 1994; Roux *et al.*, 1994; Leibovitz *et al.*, 1995), con lo que creemos queda demostrada la utilidad de la PCR en el diagnóstico de la neumonía por *P. carinii* y la conveniencia de que sea considerada como la técnica de elección por los laboratorios de Microbiología clínica.

En cuanto a la aplicación de la PCR para el diagnóstico de las infecciones por *T. gondii*, su eficacia diagnóstica depende del órgano afectado. Así, en el diagnóstico de las encefalitis por *T. gondii* la utilización del LCR como muestra para detectar la presencia del parásito tiene una sensibilidad en nuestro estudio del 40%. La muestra adecuada sería en estos casos la biopsia cerebral, que no suele practicarse en condiciones ordinarias por el grado de agresividad que representa para el paciente.

Grob *et al.* (1992) detectaron el parásito en LCR en tres pacientes (37,5%) de los ocho sometidos a estudio con infección en el SNC comprobada. Khalifa *et al.* (1994) encontraron el parásito en 15 de 52 pacientes (28,8%) con sospecha clínica de toxoplasmosis cerebral. Por su parte Parmley *et al.* (1992), describen una sensibilidad del 44,4% en el diagnóstico de la toxoplasmosis cerebral. Estos autores utilizan juegos de cebadores diferentes para la amplificación del gen B1 de *T. gondii*, así como diferentes métodos de extracción y purificación del DNA, por lo que sus resultados de sensibilidad de la técnica son difícilmente comparables. Sin embargo, aunque los trabajos publicados carecen todos ellos de series amplias de pacientes sometidos a estudio, parece posible concluir que el LCR como muestra comunmente utilizada para el estudio de la toxoplasmosis cerebral ofrece una rentabilidad inferior al 50%, lo que también se confirma en nuestro estudio.



La infección o reactivación de una infección latente localizada en otros órganos puede ser más fácilmente detectable por la mayor facilidad de abordar el foco infeccioso o por la detección del parásito en sangre u orina, ya que en estos casos se produce una fase de diseminación general (Huskinson *et al.*, 1989; Fuentes *et al.*, 1996). Así, Bretagne *et al.* (1993) detectaron seis casos de toxoplasmosis pulmonar sobre lavados broncoalveolares, todos los cuales presentaban reacción serológica positiva. En nuestra serie de los siete casos de toxoplasmosis detectados por PCR, cinco corresponden a afecciones del aparato respiratorio.

El tratamiento profiláctico que se ha generalizado en los últimos años en pacientes HIV positivos es un factor importante en la disminución de la frecuencia de detección de *T. gondii* en estos pacientes (Bretagne *et al.*, 1995). En nuestra serie de los siete casos diagnosticados por PCR, cinco corresponden al año 1994, uno a 1995 y uno a 1997, lo que parece confirmar también esta tendencia.

A la vista de nuestros resultados y los aportados por muchos otros autores, podemos concluir que la PCR es una buena aportación al diagnóstico microbiológico de la infección por *T. gondii* y, en pacientes inmunodeprimidos, el instrumento más valioso de que se dispone hasta el momento para la detección del parásito.

Otro tipo de infecciones que afectan frecuentemente a los pacientes inmunodeprimidos son las producidas por citomegalovirus. A diferencia de lo que suele pasar en pacientes inmunocompetentes, la infección por citomegalovirus en aquellos puede ser grave y afecta a órganos importantes como el hígado, pulmón, ojos, SNC, etc. La característica de persistencia del virus durante mucho tiempo después de una infección aguda o reactivación de una infección latente constituye una dificultad importante a la hora de correlacionar la detección del virus (cualquiera que sea el método que se utilice) con el cuadro clínico actual del paciente y, probablemente, antes de hacer esta correlación habrá que descartar otras causas que puedan estar implicadas en la enfermedad. El valor predictivo positivo de la infección por citomegalovirus es más elevado cuando éste se detecta en determinado tipo de muestras como, por ejemplo, en LCR, donde la detección de citomegalovirus por PCR alcanza un valor predictivo de enfermedad del 100% (Wolf *et al.*, 1992; Cinque *et al.*, 1992; Studahl *et al.*, 1995).

Parecida situación encontramos en las infecciones pulmonares cuando las muestras para detección de citomegalovirus se obtienen por métodos invasivos tales como el lavado broncoalveolar (Cathomas *et al.*, 1993; Eriksson *et al.*, 1993; Liesnart *et al.*, 1994).

En nuestra serie, de los 37 casos en que se detectó citomegalovirus en muestras clínicas tan sólo pudieron correlacionarse con infección actual del paciente un caso de afectación del SNC (detección en LCR), dos casos de infecciones respiratorias (detección en PTA) y dos infecciones de mucosa rectal (detección en tejido obtenido por biopsia), mientras que los resultados obtenidos en orina (cuatro casos) y esputo (cinco casos) no pudieron ser correctamente interpretados. Algunos autores (Miller *et al.*, 1994) propugnan intentar la detección simultáneamente en diferentes muestras del paciente como método para mejorar la correlación de los resultados con el estado del paciente.

La detección de citomegalovirus en sangre en 23 de nuestros pacientes estudiados se realizó en casos que no presentaban ninguna manifestación clínica de infección por este virus, siendo pacientes integrados en un estudio prospectivo no concluido en el que se pretende evaluar el mayor riesgo que puedan tener estos pacientes PCR positivos de desarrollar enfermedad grave por citomegalovirus en el futuro. Con ello la detección precoz por PCR podría constituir un signo predictivo importante que podría sentar la base para un tratamiento preventivo de aquellos. En resumen, la aplicación de la PCR para la detección de citomegalovirus se muestra útil aunque a veces se haga difícil la interpretación de sus resultados, pudiendo sustituir con ventaja a cualquiera de los métodos convencionales comúnmente utilizados para el diagnóstico de este tipo de infecciones. La disponibilidad en la actualidad de un tratamiento específico justifica la necesidad de un diagnóstico rápido y, por tanto, la inclusión de una técnica adecuada para la obtención de tales resultados.

6. UTILIDAD DE LA PCR PARA EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE OTROS AGENTES INFECCIOSOS.-

La aplicación de la PCR en nuestro estudio para el diagnóstico de otros agentes infecciosos que pueden afectar a pacientes inmunodeprimidos o pacientes inmunocompetentes se ha demostrado también útil y ofrece ventajas sobre los métodos convencionales.

En las infecciones producidas por el virus herpes simplex hemos aplicado la técnica fundamentalmente para el diagnóstico de las infecciones genitales o bucales de pacientes sin inmunodeficiencia con resultados excelentes, ya que ofrece una sensibilidad y especificidad del 100% en todos aquellos casos clínicamente sugestivos de infección herpética. Thomas *et al.* (1992), en uno de los pocos estudios que existen en la literatura sobre la aplicación de la PCR en este tipo de muestras, encontraron una sensibilidad superior al cultivo identificando 55 casos de infección herpética detectados por cultivo y seis casos más en que el cultivo dio resultados negativos. Así mismo, Safrin *et al.* (1997) reflejan la superioridad de la PCR sobre el cultivo en muestras genitales.

En pacientes inmunodeprimidos la PCR ha sido particularmente útil en el diagnóstico de las infecciones del SNC (meningitis o meningoencefalitis) permitiendo la realización del diagnóstico en 9 pacientes. En tres de estos pacientes se hizo estudio serológico con resultados positivos en dos de ellos y negativo en el tercero. En uno de estos casos se registró IgM positiva mientras que en el otros solamente se detectó un título alto de IgG difícil de interpretar sin tener en cuenta el resultado de la PCR. En ausencia de la práctica de cultivos celulares para el aislamiento del virus, los resultados obtenidos por PCR son importantes dada la urgencia en el inicio del tratamiento para conseguir una buena evolución de la enfermedad. Nuestros resultados en las infecciones del SNC concuerdan con los obtenidos por otros autores sobre pacientes inmunodeprimidos (Rozemberg *et al.*, 1991; Aslanzadeh *et al.*, 1992; Koskiniemi *et al.*, 1996).

Aunque existen técnicas convencionales rápidas para la detección de herpes simplex, útiles sobre todo en muestras cutáneas, la PCR constituye una buena alternativa

aplicable a todo tipo de muestras pudiendo suplir con ventaja incluso los cultivos celulares.

Otro tipo de infecciones, comunes sobre todo en pacientes pediátricos, son las producidas por enterovirus. Estas afecciones aparecen en pequeños brotes epidémicos durante los meses de verano y se manifiestan por un síndrome febril a veces acompañado de exantemas y en algunos casos con afectación del SNC. Las técnicas diagnósticas habituales de las infecciones por enterovirus recaen sobre todo en la serología (reacción de fijación del complemento) o en el aislamiento mediante cultivos celulares. La serología tiene una sensibilidad baja debido sobre todo a la dificultad de englobar en una sola técnica la gran cantidad de serotipos diferentes y la ausencia de serotipos comunes para todos los enterovirus (Rotbart, 1991) El cultivo celular es considerado como el estándar de oro para la detección de enterovirus a pesar de sus limitaciones, como son la imposibilidad de algunas cepas de replicarse en los cultivos y el crecimiento lento de algunos serotipos (Wilden *et al.*, 1987; Chonmaitre *et al.*, 1992).

La utilización de una estrategia de diagnóstico por PCR basada en unos cebadores que amplifican fragmentos de la región 5'NTR del genoma de enterovirus, que constituye la región más conservada del genoma de los mismos (Rueckert, 1990), permite aplicar esta técnica para su diagnóstico con grandes ventajas sobre los otros procedimientos microbiológicos. Nosotros hemos utilizado la PCR sobre 96 muestras procedentes de 40 pacientes con clínica compatible con infección por enterovirus con resultados positivos sobre 25 muestras (16 pacientes). El hecho de no disponer de una técnica de referencia en todos los casos no nos permite establecer datos comparativos para valorar la sensibilidad clínica de la PCR. Por otra parte, la inespecificidad del cuadro clínico tampoco permite establecer cuántos de estos pacientes estudiados presentaban con certeza una infección por enterovirus. En 12 pacientes en los que se realizaron paralelamente cultivos celulares para el aislamiento de enterovirus (correspondiendo en todos los casos a LCRs) los resultados fueron negativos al igual que la PCR.

Otros autores, en el diagnóstico de las meningitis por enterovirus, han encontrado que la sensibilidad de la PCR es superior a la del cultivo en un 8% (Glimaker *et al.*, 1993) o en un 20% (Sawyer *et al.*, 1994). Sabine *et al.* (1996), utilizando una técnica

comercial, detectaron una diferencia del 32% a favor de la PCR. Por otra parte los resultados de la PCR pueden obtenerse en menos de 24 horas, mientras que el cultivo necesita una media de 6-7 días. El nivel de sensibilidad y especificidad de la PCR, junto a la posibilidad de hacer una detección rápida que permita establecer el diagnóstico en las primeras horas, avalan la introducción de esta técnica para el diagnóstico de la infección por enterovirus como método de elección, pudiendo sustituir perfectamente y con ventaja tanto la serología como los cultivos celulares.

La aplicación de la PCR, utilizando en cada caso los cebadores específicos correspondientes, nos ha permitido poder realizar el diagnóstico microbiológico en tres casos de infección por Parvovirus B19 en sendos pacientes inmunodeprimidos con un cuadro severo de anemia, así como el diagnóstico de una infección por *Leishmania* en un paciente HIV positivo con un cuadro de fiebre de origen desconocido. Otro paciente que presentaba trastornos neurológicos fue diagnosticado por PCR de infección por virus JC. Aunque el número de estos casos es reducido para poder llegar a conclusiones estadísticas en este tipo de infecciones, queda demostrada la utilidad de la PCR al menos como una herramienta que posibilita la detección directa de estos microorganismos cubriendo el déficit de las técnicas microbiológicas clásicas por lo que se refiere a Parvovirus B19 y virus JC, y paliando la baja sensibilidad de las tinciones para el diagnóstico de las leishmaniasis sistémicas (Laskay *et al.*, 1995).

Finalmente, la PCR se muestra también en nuestro estudio como una técnica alternativa excelente para la detección de *Plasmodium* en sangre. Se obtuvieron cinco resultados positivos todos ellos confirmados por visualización directa del parásito mediante extensiones en porta de sangre periférica. La hibridación con sondas específicas permitió la identificación de especie en los cinco casos: dos de infección por *P. falciparum* y tres por *P. vivax*. Otros cuatro pacientes fueron estudiados con las dos técnicas en paralelo con resultados negativos, y tres pacientes sólo por PCR con resultados también negativos. En comparación con las técnicas clásicas, la PCR se muestra tan eficaz como estas ofreciendo, además, la ventaja de poder realizar una identificación de especie altamente específica, útil sobre todo en aquellos casos en que el estudio morfológico puede ser dudoso.

En zonas endémicas de paludismo y con series estudiadas mucho más amplias, Felger *et al.* (1995) han demostrado que la PCR es más sensible que las técnicas microscópicas tanto en la detección de *Plasmodium* como de infecciones mixtas.

7. ANÁLISIS DE LA CONTAMINACIÓN MOLECULAR.-

El problema más importante de la utilización rutinaria de las técnicas de amplificación en el diagnóstico clínico lo constituye la aparición de falsos positivos debido a la contaminación molecular. La acumulación de productos de PCR (amplicones) en el laboratorio producida por amplificaciones repetidas de una misma secuencia junto con la enorme sensibilidad de la técnica, hacen que la transferencia de pequeñas cantidades de esta secuencia de un tubo a otro pueda dar lugar a estos resultados falsos positivos (Kwok *et al.*, 1989). Para evitar este grave problema los laboratorios que utilizan sistemáticamente la PCR como herramienta diagnóstica deben adoptar una serie de medidas preventivas previamente señaladas en el capítulo de Introducción de esta Memoria. Si el laboratorio adopta todas estas medidas desde el principio el problema de la contaminación queda muy minimizado.

En nuestro caso, utilizando la PCR como método diagnóstico rutinario desde 1992, hemos tenido a lo largo de estos cinco años dos episodios de contaminación molecular, afectando al proceso de amplificación de la secuencia de inserción de *M. tuberculosis* y de la secuencia específica de herpes simplex. El problema se solventó desechando todos los reactivos utilizados en la PCR y preparando nuevos lotes. En ninguno de estos casos los resultados falsos positivos trascendieron al clínico y la repetición de la técnica aportó finalmente los resultados válidos.

En nuestra experiencia, creemos que si bien el peligro de la contaminación molecular es realmente muy importante y en modo alguno puede ser pasado por alto, sin embargo la aplicación de una técnica depurada y de las medidas de prevención habituales reducen este problema a niveles mínimos no diferentes de los encontrados en otras técnicas microbiológicas, por lo que no debe ser obstáculo este problema para la utilización rutinaria de la PCR en el diagnóstico microbiológico.

8. ANÁLISIS DEL COSTE ECONÓMICO DE LA PCR.-

Las consecuencias económicas de la introducción de nuevas tecnologías en los laboratorios de Microbiología deben ser tenidas en cuenta siempre a fin de no contribuir a disparar el coste sanitario público que ya de por sí constituye una carga económica importante para los países. En este sentido son válidas las indicaciones del Center for Disease Control and Prevention (CDC, 1993): "una técnica concreta no debe ser reemplazada por otra diferente si esta última no es al menos equivalente en sensibilidad y especificidad a la antigua y su coste no difiera substancialmente de ella". A diferencia de las técnicas de amplificación comercializadas que hasta el momento tienen unos precios prohibitivos, la PCR convencional (conocida habitualmente como "casera") es asequible económicamente a cualquier laboratorio ya que su coste no difiere substancialmente de otras técnicas similares (en muchos casos está por debajo) comunmente utilizadas en los diagnósticos convencionales (detección de antígeno por técnicas de látex, inmunofluorescencia o ELISA). El coste calculado para cada reacción de PCR realizada en nuestro laboratorio está situado entre la 300 pts, si se realiza el proceso de extracción clásico y la detección del producto amplificado por electroforesis, y las 850 pts en el caso de que el método de extracción sea una técnica rápida comercializada. En el caso de detección del producto amplificado mediante sondas de hibridación comercializadas habría que sumar al coste anterior otras 1600 pts.

Por otra parte, la eficacia diagnóstica de la PCR hace que el clínico prescindiera de la realización de otras técnicas microbiológicas, en ocasiones más costosas y menos rentables que la PCR, lo que necesariamente se refleja en el coste final del laboratorio. Desde 1992, año en que iniciamos la aplicación de las técnicas diagnósticas por PCR, se han realizado las siguientes determinaciones: 192 en 1992, 345 en 1993, 1296 en 1994, 1356 en 1995 y 1496 en 1996. Sorpresivamente, el coste global económico de nuestro laboratorio ha ido descendiendo desde 1992 a 1996 (de 32 a 26 millones de pesetas).

En nuestro caso, pues, la introducción de la PCR como método rutinario no ha supuesto un incremento presupuestario adicional a pesar de que el número de PCRs

realizadas se va incrementado año tras año. Ello es debido en primer lugar a que el coste de la PCR convencional es razonable y en segundo lugar a que su utilización permite sustituir a otras técnicas habituales con lo que el balance final es netamente positivo.

F) CONCLUSIONES

El análisis de los resultados reflejados en esta Memoria nos permiten extraer las siguientes conclusiones:

1.- La utilización de la PCR "casera" combinada con un método rápido de extracción de ácidos nucleicos permite dar una respuesta adecuada a las necesidades diagnósticas de un laboratorio clínico frente a todos aquellos microorganismos que se incluyan racionalmente en un protocolo de diagnóstico por esta técnica, ofreciendo la posibilidad de dar resultados útiles para el clínico en 24 horas.

2.- Como norma general, y en un protocolo de aplicación rutinaria de la PCR para el diagnóstico microbiológico, los métodos de extracción rápidos deben ser considerados como los de elección ya que son los que mejor se adaptan a las características de un laboratorio clínico. Aunque su sensibilidad es ligeramente inferior a la de los métodos clásicos, sin embargo ésta es suficiente para detectar el microorganismo buscado en la mayor parte de situaciones clínicas, siempre que se disponga de una muestra representativa del foco infeccioso.

3.- La inclusión de los microorganismos más frecuentes en las infecciones respiratorias adquiridas en la comunidad dentro de un diseño diagnóstico por PCR permite no sólo mejorar la sensibilidad de los métodos de cultivo convencionales sino también aportar los datos microbiológicos en un tiempo útil para el paciente. El establecimiento de criterios para determinar en cada caso el mejor método de obtención de una muestra clínica de calidad repercutiría indudablemente en una mayor eficacia diagnóstica de la PCR.

4.- En la infección tuberculosa la PCR ofrece la ventaja de la identificación de la micobacteria sin necesidad de esperar el resultado del cultivo. Aunque, en nuestra serie, hemos detectado por PCR casos de infección tuberculosa no confirmados por el cultivo, también se ha dado el caso contrario, por lo que creemos que las técnicas de amplificación deben usarse de forma complementaria a los métodos convencionales, con lo cual la eficacia clínica del diagnóstico de la tuberculosis se ve mejorada notablemente.

5.- Dada la elevada rentabilidad diagnóstica de la PCR en las infecciones bacterianas del SNC y la importancia de un diagnóstico etiológico rápido en estos casos,

los laboratorios clínicos deberían utilizar un diseño de PCR adecuado para este diagnóstico como complemento a las técnicas microbiológicas convencionales. Particularmente eficaz se muestra la PCR en el diagnóstico de meningitis meningocócicas o neumocócicas en aquellos pacientes que han recibido tratamientos antibióticos previos.

6.- En pacientes inmunodeprimidos, la PCR es una técnica muy útil para el diagnóstico de muchas de las infecciones producidas por gérmenes oportunistas. La escasa rentabilidad de los métodos serológicos en estos casos así como la complejidad de los cultivos para el aislamiento de algunos de estos microorganismos hacen que la PCR se muestre como un método microbiológico alternativo más rápido y eficaz que los métodos de la Microbiología convencional.

7.- La disponibilidad de la PCR como técnica diagnóstica permite dotar al laboratorio de una herramienta muy útil para la detección de posibles microorganismos de interés puntual (patologías no habituales en nuestro medio, brotes epidémicos con características peculiares, etc.) ya que la infraestructura de un laboratorio de PCRs permite montar un diseño diagnóstico nuevo en pocos días.

8.- La introducción de la PCR "casera" en el diagnóstico clínico habitual no se traduce en un incremento de los costes finales del laboratorio ya que los gastos derivados de la PCR se ven compensados por la eliminación de otras técnicas y por la disminución de solicitudes de otros métodos diagnósticos menos eficaces.

G) REFERENCIAS

-
- Abzug MJ, Loeffelholz M, Rotbart HA. 1995. Diagnosis of neonatal enterovirus infection by polymerase chain reaction. *J Pediatr* 126: 447-450

 - Aguirre I, Bilbao JJ, Olarreaga M, Narzbal M, Aguinaga JR, Venture I. 1993. Neumonias adquiridas en la comunidad de Andoain. *Aten Primaria* 12: 359-362.

 - Aksamit A. 1993. PCR detection of JC virus. En: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds), *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and applications*, pp. 361-366. ASM Press, Washington, USA.

 - Almirall J, Morató F, Riera F, Verdaguer A, Priu R, Coll P *et al.* 1993. Incidence of community-acquired pneumonia and *Chlamydia pneumoniae* infection: a prospective multicentre study. *Eur Respir J* 6: 14-18.

 - Amicosante M., Richeldi L, Trenti G, Paone G, Campa M, Bisetti A, Saltini C. 1995. Inactivation of polymerase inhibitors for *Mycobacterium tuberculosis* DNA amplification in sputum by using capture resin. *J Clin Microbiol* 33: 629-630.

 - Andreoletti L, Hober D, Belaich S, Lobert PE, Dewilde A, Watre P. 1996. Rapid detection of enterovirus in clinical specimens using PCR and microwell capture hybridization assay. *J Virol Methods* 62: 1-10.

 - Armbruster C, Pokieser L, Hassl A. 1995. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by bronchoalveolar lavage in AIDS patients. Comparison of Diff-Quik, fungifluor stain, direct immunofluorescence test and polymerase chain reaction. *Acta Cytol* 39: 1089-1093.

 - Aslanzadeh J, Osmon DR, Wilhelm MP, Espy MJ, Smith TF. 1992. A prospective study of the polymerase chain reaction for detection of herpes simplex virus in cerebrospinal fluid submitted to the clinical virology laboratory. *Mol Cell Probes* 6: 367-373

 - Atzori C, Lu JJ, Jiang B, Barlett MS, Orlando G, Queener SF *et al.* 1995. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS patients by using polymerase chain reaction on serum specimens. *J Infect Dis* 172: 1623-1626.

-
- Aubert D, Fondrinier F, Villena I, Pinon JM, Biava MF, Renoult E. 1996. PCR for diagnosis and follow-up of two cases of disseminated toxoplasmosis after kidney grafting. *J Clin Microbiol* 34: 1347.
 - Bennedsen J, Ostegaard B, Pfyffer GE, Funke G, Feldman K, Beneke A *et al.* 1996. Utility of PCR in diagnosing pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 34: 1407-1411.
 - Berenguer J, Moreno S, Cercenado E, Quirós B, Fuente AC, Bouza E. 1989. Visceral leishmaniasis in patients infected with human immunodeficiency virus (HIV) *Ann Intern Med* 111: 129-132.
 - Bergmann JS, Woods GL. 1996. Clinical evaluation of the Roche Amplicor PCR *Mycobacterium tuberculosis* test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 34: 1083-1085.
 - Bernet C, Garret M, Barbeyrac B, Bebear C, Bonnet J. 1989. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 27: 2492-2496.
 - Bitsch A, Kirchner H, Dupke R, Bein G. 1992. Failure to detect human cytomegalovirus DNA in peripheral blood leukocytes of healthy blood donors by the polymerase chain reaction. *Transfusion* 32: 612-617.
 - Black CM, Fields PI, Messmer TO, Berdal BP. 1994. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in clinical specimens by polymerase chain reaction using nested primers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13: 752-756.
 - Blackmore TK, Reznikov M, Gordon DL. 1995. Clinical utility of the polymerase chain reaction to diagnose *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Pathology* 27: 177-81.
 - Blackwell JM. 1992. Leishmaniasis epidemiology: all down to the DNA. *Parasitology* 104 (Suppl): S19-34.

-
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim PM, Noordaa J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28: 495-503.
 - Bretagne S, Costa JM, Fleith JF, Poron F, Dubreil ML, Vidaud M. 1995. Quantitative competitive PCR with bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of toxoplasmosis in AIDS patients. *J Clin Microbiol* 33: 1662-1664.
 - Bretagne S, Costa JM, Vidaud M, Tran J, Nhieu V, Fleury FJ. 1993. Detection of *Toxoplasma gondii* by competitive DNA amplification of bronchoalveolar lavage samples. *J Infect Dis* 168: 1585-1588.
 - Brice SL, Stockert SS, Jester JD, Huff JC, Bunker JD, Weston WL. 1992. Detection of Herpes simplex virus DNA in the peripheral blood during acute recurrent herpes labialis. *J Am Acad Dermatol* 26: 594-598.
 - Brisson-Noel A, Lecossier D, Nassif X, Gicquel B, Levy-Frebault V, Hance AJ. 1989. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet* 336: 1069-1071.
 - Brisson NA, Aznar C, Chureau C, Nguyen S, Pierre C, Bartoli M, Bonete R, Pialoux G, Gicquel B, Garrigue G. 1991. Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. *Lancet* 338: 364-366.
 - Bruce-Chwatt LJ. 1979. Man against malaria: Conquest or defeat. *R Soc Trop Med Hyg* 73: 605-617.
 - Buck GE, O'Hara LC, Summersgill JT. 1992. Rapid, sensitive detection of *Mycoplasma pneumoniae* in simulated clinical specimens by DNA amplification. *J Clin Microbiol* 30: 3280-3283.
 - Buck GE, O'Hara LC, Summersgill JT. 1992. Rapid, simple method for treating clinical specimens containing *Mycobacterium tuberculosis* to remove DNA for polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30:1331-1334.

-
- Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC. 1989. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 27: 1787-1792.
 - Campbell LA, Perez Melgosa M, Hamilton DJ, Kuo CC, Grayston JT. 1992. Detection of *Chlamydia pneumoniae* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30: 434-439.
 - Cantin E, Chen J, Gaidulis L, Valo Z, McLaughlin-Taylor E. 1994. Detection of herpes simplex virus DNA sequences in human blood and bone marrow cells. *J Med Virol* 42: 279-286.
 - Carriere C, Boulanger P, Delsert C. 1993. Rapid and sensitive method for the detection of B19 virus DNA using the polymerase chain reaction with nested primers. *J Virol Methods* 44: 221-234.
 - Cartwright CP, Nelson NA, Gill VJ. 1994. Development and evaluation of a rapid and simple procedure for detection of *P. carinii* by PCR. *J Clin Microbiol* 32: 1634-1638.
 - Cassinotti P, Weitz M, Siegl G. 1993. Human Parvovirus B19 infections: routine diagnosis by a new nested polymerase chain reaction assay. *J Med Virol* 40: 228-234.
 - Castuyvels R, Ridder C, Jonckheere S, Verbist L, Eldere J. 1996. Prospective clinical evaluation of Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* PCR test as a screening method in a low-prevalence population. *J Clin Microbiol* 34: 2001-2003.
 - Cathomas G, Morris P, Pekle K, Cunningham I, Emanuel D. 1993. Rapid diagnosis of Cytomegalovirus pneumonia in marrow transplant recipients by bronchoalveolar lavage using the polymerase chain reaction, virus culture, and the direct immunostaining of alveolar cells. *Blood* 81: 1909-1914.
 - Chonmaitre T, Menegus M, Powell KR. 1982. The clinical relevance of CSF culture. A two year experience with aseptic meningitis in Rochester, New York. *JAMA* 247: 1843-1847.

- Cinque P, Vago L, Brytting M, Castagna A, Accordini A, Sundqvist VA, Zanchetta N, Monforte AD, Wahren B, Lazzarin A *et al.* 1992. Cytomegalovirus infection of the central nervous system in patients with AIDS: diagnosis by DNA amplification from cerebrospinal fluid. *J Infect Dis* 166: 1408-1411.

- Ciulla TA, Sklar RM, Hauser SL. 1988. A simple method for DNA purification from peripheral blood. *Anal Biochem* 174: 485-488.

- Clewley J. 1993. PCR detection of Parvovirus B19. En: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds), *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and applications*, pp. 367-373. ASM Press, Washington, USA.

- Clewley J.P. 1989. Polymerase chain reaction assay of Parvovirus B19 DNA in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 27: 2647-2651.

- Clifford DB, Buller RS, Mohammed S, Robison L, Storch G. 1993. Use of polymerase chain reaction to demonstrate Cytomegalovirus DNA in CSF of patients with human immunodeficiency virus infection. *Neurology* 43: 75-79.

- Condos R, McClune A, Rom WN, Schluger NW. 1996. Peripheral-blood-based PCR assay to identify patients with active pulmonary tuberculosis. *Lancet* 347: 1082-1085.

- Cone R. W, Hobson AC, Huang ML. 1992. Coamplified positive control detects inhibition of polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30: 3185-3189.

- Corey LC, Spear PG. 1986. Infections with herpes simplex viruses. *N Engl J Med* 314: 686-691.

- Costa JM, Durand R, Deniau M, Rivollet D, Izri M, Houin R, Vidaud M, Bretagne S. 1996. PCR enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of leishmaniasis in human immunodeficiency virus infected patients. *J Clin Microbiol* 34: 1831-1833.

- Cunningham R, Harris A, Frankton A, Irving W. 1995. Detection of Cytomegalovirus using PCR in serum from renal transplant recipients. *J Clin Pathol* 48: 575-577.

- Daiminger A, Schalasta G, Betzl D, Enders G. 1994. Detection of human Cytomegalovirus in urine samples by cell culture, early antigen assay and polymerase chain reaction. *Infection* 22: 24-28.

- Dalhoff K, Maass M. 1996. *Chlamydia pneumoniae* pneumonia in hospitalized patients. Clinical characteristics and diagnostic value of polymerase chain reaction detection in BAL. *Chest* 110: 351-356.

- de Wit D, Wootton M, Allan B, Steyn L. 1993. Simple method for production of internal control DNA for *Mycobacterium tuberculosis* polymerase chain reaction assays. *J Clin Microbiol* 31: 2204-2207.

- Delacourt C, Poveda JD, Chureau C, Beydon N, Mahut B, de-Blic J, Scheinmann P, Garrigue G. 1995. Use of polymerase chain reaction for improved diagnosis of tuberculosis in children. *J Pediatr* 126: 703-709.

- Delgado R, Lumbreras C, Alba C, Pedraza MA, Otero JR, Gómez R *et al.* 1992. Low predictive value of polymerase chain reaction for diagnosis of Cytomegalovirus disease in liver transplant recipients. *J Clin Microbiol* 30: 1876-1878.

- Dilworth JP, Goyal M, Young DB, Shaw RJ. 1996. Comparison of polymerase chain reaction for IS6110 and Amplicor in the diagnosis of tuberculosis. *Thorax* 51: 320-322.

- Doern G.V. 1996. Diagnostic mycobacteriology: where are we today ?. *J Clin Microbiol* 34: 1873-1876.

- Dong ZW, Yan C, Yi W, Cui YQ. 1994. Detection of congenital cytomegalovirus infection by using chorionic villi of the early pregnancy and polymerase chain reaction. *Int J Gynaecol Obstet* 44: 229-231.

- Dorca J. 1988. Estudio comparativo entre el cepillado bronquial mediante catéter telescópico y la punción transtorácica aspirativa con aguja ultrafina en el diagnóstico de la neumonía de alto riesgo. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona.

- Dorries K, Vogel E, Gunther S, Czub S. 1994. Infection of human polyomaviruses JC and BK in peripheral blood leukocytes from immunocompetent individuals. *Virology* 198: 59-70.

- Dowson CG, Hutchinson A, Spratt BG. 1989. Extensive re-modelling of the transpeptidase domain of penicillin-binding protein 2B of a penicillin-resistant South African isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 3:95-102.

- Dragon EA. 1993. Handling reagents in the PCR laboratory. *PCR Methods Appl* 3: 127-129.

- Drouet E, Boibieux A, Michelson S, Ecochard R, Biron F, Peyramond D, Colimon R, Denoyel G. 1993. Polymerase chain reaction detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood leukocytes as a predictor of cytomegalovirus disease in HIV-infected patients. *AIDS* 7: 665-668.

- Edberg SC. 1985. Principles of nucleic acid hybridation and comparison with monoclonal antibody technology for the diagnosis of infectious diseases. *Yale J Biol Med* 58: 425-442.

- Ehrlich GD, Greenberg SJ, 1994. PCR-based diagnostics in infectious disease. Blackwell Sci Publ, Oxford, Inglaterra.

- Ehrlich GD, Glaser J, Lavigne K *et al.* 1989. Prevalence of human T-cell leukemia/lymphoma virus type II infection among high risk individuals: type-specific identification of HTLVs by polymerase chain reaction. *Blood* 74: 1658-1664.

- Ehrlich GD. 1991. Caveats of PCR. *Clin Micro News* 13: 149-151.

- Einsele H, Steidle M, Vallbracht A, Saal JG, Ehninger G, Muller CA. 1991. Early occurrence of human Cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation as demonstrated by the polymerase chain reaction technique. *Blood* 77: 1104-1110.

- Eisenach KD, Sifford MD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT. 1991. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using a polymerase chain reaction. *Am Rev Respir Dis* 144: 1160-1163.

- Eisen D, Ross BC, Fairbairn J, Warren RJ, Baird RW, Dwyer B. 1994. Comparison of *Pneumocystis carinii* detection by toluidine blue O staining, direct immunofluorescence and DNA amplification in sputum specimens from HIV positive patients. *Pathology* 26: 198-200.

- Ellner PD, Kiehn TE, Cammarata R, Hosmer M. 1988. Rapid detection and identification of pathogenic mycobacteria by combining radiometric and nucleic acid probe methods. *J Clin Microbiol* 26: 1349-1352.

- Elvin K. 1994. Laboratory diagnosis and occurrence of *Pneumocystis carinii*. *Scand J Infect Dis Suppl* 94: 1-34.

- Eriksson BM, Brytting M, Zwegberg-Wirgart B, Hillerdal G, Olding Stenkvist E, Linde A. 1993. Diagnosis of cytomegalovirus in bronchoalveolar lavage by polymerase chain reaction, in comparison with virus isolation and detection of viral antigen. *Scand J Infect Dis* 25: 421-427.

- Espinosa de los Monteros LE. 1993. Reacción de polimerasa en cadena (PCR) en el diagnóstico clínico. Revisión del uso de la técnica. *Rev Latinoam Microbiol* 35: 225-230.

- Espy M.J, Patel R, Paya CV, Smith TF. 1995. Comparison of three methods for extraction of viral nucleic acids from blood cultures. *J Clin Microbiol* 33: 41-44.

- Espy MJ, Smith TF, Persing DH. 1993. Dependence of polymerase chain reaction product inactivation protocols on amplicon length and sequence composition. *J Clin Microbiol* 31:2361-2365.

- Evans R, Joss AW, Pennington TH, Ho-Yen D. 1995. The use of a nested polymerase chain reaction for detecting *Pneumocystis carinii* from lung and blood in rat and human infection. *J Med Microbiol* 42: 209-213.

-
- Fairfax MR, Metcalf MA, Cone RW. 1991. Slow inactivation of dry PCR templates by UV light. *PCR Method Applic* 1: 142-143.
 - Falguera M, Nogués A, Ruiz A, García M, Puig T. 1996. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by polymerase chain reaction in lung aspirates from patients with community-acquired pneumonia. *Chest* 110: 972-976.
 - Falguera M, Nogués A, Ruiz A. 1996. Community-acquired *Chlamydia pneumoniae* pneumonia. *Thorax*. 51: 967-968.
 - Falguera M, Nogues A, Ruiz-Gonzalez A, Garcia M, Puig T, Rubio M. 1994. Transthoracic needle aspiration in the study of pulmonary infections in patients with HIV. *Chest* 106: 697-702.
 - Felger I, Tavul L, Narara A, Genton B, Alpers M, Beck HP. 1995. The use of the polymerase chain reaction for more sensitive detection of *Plasmodium falciparum*. *P N G Med J* 38: 52-56.
 - Folgueira L, Delgado R, Palenque E, Noriega AR. 1993. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in clinical samples by using a simple lysis method and polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 31: 1019-1021.
 - Folgueira L, Delgado R, Palenque E, Aguado JM, Noriega A. 1996. Rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* bacteriemia by PCR. *J Clin Microbiol* 34: 512-515.
 - Forster AC, McInnes JL, Skingle DC, Symons TH. 1985. Non-radioactive hybridization probes prepared by the chemical labelling of DNA and RNA with a novel reagent, photobiotin. *Nucleic Acids Res* 13: 745-761.
 - Fox JC, Ait-Khalid M, Webster A, Emery VC. 1991. Eliminating PCR contamination: is UV irradiation the answer?. *J Virol Methods* 33: 375-383.
 - Foy HM, Cooney MK *et al.* 1979. Rates of pneumonia during influenza epidemics in Seattle, 1964 to 1975. *JAMA* 241: 243-258.

-
- Fridell E, Bekassy AN, Larsson B, Eriksson BM. 1992. Polymerase chain reaction with double primer pairs for detection of human Parvovirus B19 induced aplastic crises in family outbreaks. *Scan J Infect Dis* 24: 275-282.
 - Friedland LR, Menon AG, Reising SF, Ruddy RM, Hassett DJ. 1994. Development of a polymerase chain reaction assay to detect the presence of *Streptococcus pneumoniae* DNA. *Diag Microbiol Infect Dis* 20: 187-193.
 - Fuentes I, Rodriguez M, Domingo CJ, Castillo F, Juncosa T, Alvar J. 1996. Urine sample used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. *J Clin Microbiol* 34: 2368-2371.
 - Gallez GM, Tegtmeier BR, Veer A, Niland JC, Forman SJ, Zaia JA. 1997. Evaluation of a quantitative plasma PCR plate assay for detecting cytomegalovirus infection in marrow transplant recipients. *J Clin Microbiol* 35: 788-790.
 - Gaydos CA, Roblin PM, Hammerschlag MR, Hyman CL, Eiden JJ, Schachter J *et al.* 1994. Diagnostic utility of PCR-Enzyme Immunoassay, culture, and serology for detection of *Chlamydia pneumoniae* in symptomatic and asymptomatic patients. *J Clin Microbiol* 32: 903-905.
 - Gaydos CA, Fowler CL, Gill VJ, Eiden JJ, Quinn TC. 1993. Detection of *Chlamydia pneumoniae* by polymerase chain reaction-enzyme immunoassay in an immunocompromised population. *Clin Infect Dis* 17: 718-723.
 - Gillespie SH, Ullman C, Smith MD, Emery V. 1994. Detection of *Streptococcus pneumoniae* in sputum samples by PCR. *J Clin Microbiol* 32: 1308-1311.
 - Gleason K, Lichty MB, Jungkind DL, Giger O. 1995. Evaluation of Amplicor PCR for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens. *J Clin Microbiol* 33:2582-2586.
 - Glimaker M, Johansson B, Olcen P, Ehrnst A, Forsgren MI. 1993. Detection of enteroviral RNA by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid from patients with aseptic meningitis. *Scand J Infect Dis* 25: 547-457.

-
- Golightly MG, Thomas JA, Viciano AL. 1990. The laboratory diagnosis of Lyme borreliosis. *Lab Med* 21: 299-304.
 - Grayston JT, Kuo CC, Campbell LA, Wang SP. 1989. *Chlamydia pneumoniae* species nova for Chlamydia sp strain TWAR. *Int J Syst Bacteriol* 39: 89-90.
 - Grayston JT. 1992. Infections caused by *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. *Clin Infect Dis* 15: 757-763.
 - Greenfield C, Sinickas V, Harrison LC. 1991. Detection of Cytomegalovirus by the polymerase chain reaction. A simple, rapid and sensitive non-radioactive method. *Med J Aust* 154: 383-385.
 - Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D. 1994. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 32: 335-351.
 - Grob U, Roggenkamp A, Janischke K, Heesemann J. 1992. Improved sensitivity of polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii* in biological and human clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 11: 33-39.
 - Grover CM, Thulliez P, Remington JS, Boothroyd JC. 1990. Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. *J Clin Microbiol* 28: 2297-2301.
 - Grundy JE, Ehrenst A, Eisele H, Emery VC, Hebart H, Prentice HG *et al.* 1996. A three center european external quality control study of PCR for detection of Cytomegalovirus DNA in blood. *J Clin Microbiol* 34: 1166-1170.
 - Guay JM, Dubois D, Morency MJ, Gagnon S, Mercier J, Levesque RC. 1993. Detection of the pathogenic parasite *Toxoplasma gondii* by specific amplification of ribosomal sequences using comultiplex polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 31: 203-207.
 - Gupta P, Brady M, Raabe M *et al.* 1991. Detection of HIV by virus culture and PCR in children born to seropositive mothers. *AIDS* 4: 1004-1006.

-
- Gustincich S. 1991. A fast method for high quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Bio Techniques* 11: 298-301.
 - Hance AJ, Granchamp B, Levy V, Lecossier D, Rauzier J, Bocart D, Gicquel B. 1989. Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. *Mol Microbiol* 3: 843-849.
 - Hashimoto T, Suzuki K, Amitani R, Kuze F. 1995. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputa by the amplification of IS6110. *Intern Med* 34: 605-610.
 - Hassan-king M, Baldeh I, Seccka O, Falade A, Greenwood B. 1994. Detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in blood cultures by PCR. *J Clin Microbiol* 32: 1721-1724.
 - Hassan-King M, Baldeh I, Adegbola R, Omosigho C, Usen SO, Aparango A, Greenwood BM. 1996. Detection of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* DNA in blood cultures by a single PCR assay. *J Clin Microbiol* 34: 2030-2032.
 - Henson J, Roseblum M, Armstrong D, Furneaux H. 1991. Amplification of JC virus DNA from brain and cerebrospinal fluid or patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology* 41: 1967-1971.
 - Ho M. 1982. *Cytomegalovirus: biology and infection*. Plenum Press. New York.
 - Hohlfeld P, Daffos F, Costa JM, Thulliez P, Forestier F, Vidaud M. 1994. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. *N Engl J Med* 331: 695-699.
 - Huskinson J, Stepick P, Remington J. 1989. Detection of antigens in urine during acute toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 27: 1099-1101.
 - Hyppia T, Jalava A, Larsen SH, Thero P, Hukkanen V. 1985. Detection of *Chlamydia trachomatis* in clinical specimens by nucleic acid spot hybridation. *J Gen Microbiol* 131: 975-978.

- Ieven M, Goosens H. 1997. Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in Clinical Laboratory. *Clin Microbiol Rev* 10: 242-256.

- Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. 1990. PCR protocols. A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, California, USA.

- James GS, Sintcheuke VG, Dickeson DJ, Gilbert GL. 1996. Comparison of cell culture, mouse inoculation and PCR for detection of *Toxoplasma gondii*: effects of storage conditions on sensitivity. *J Clin Microbiol* 34: 1572-1575.

- Jaulhac B, Nowicki M, Bornstein N, Meunier O, Prevost G, Piemont Y *et al.* 1992. Detection of *Legionella spp.* in bronchoalveolar lavage fluids by DNA amplification. *J Clin Microbiol* 30: 920-924.

- Jernigan DB, Hofmann J, Cetron MS, Genese CA, Nuorti JP, Fields BS, Benson RF, Carter RJ, Edelstein PH, Guerrero IC, Paul SM, Lipman HB, Breiman R. 1996. Outbreak of Legionnaires' disease among cruise ship passengers exposed to a contaminated whirlpool spa. *Lancet* 347: 494-499.

- Jeroen HT, Tjhie T, van Kuppeveld JM, Roosendaal R, Melchers JG, McLaren D.M *et al.* 1994. Direct PCR enables detection of *Mycoplasma pneumoniae* in patients with respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* 32: 11-16.

- Joklik WK, Willett HP, Amos BD. 1994. *Microbiologia de Zinsser* (20^a ed). Editorial Panamericana. Buenos Aires.

- Joss AW, Ho-Yen DO. 1997. The effect of sample storage on polymerase chain reaction-based detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluids. *J Med Microbiol* 46: 92-96.

- Kallin M, Lindberge AA. 1983. Diagnosis of pneumococcal pneumonia: a comparison between microscopic examination of expectorate, antigen detection, and cultural procedures. *Scand J Infect Dis* 15: 247-255.



-
- Keller GH, Huang DP, Shih JW, Manak MM. 1990. Detection of hepatitis B virus DNA in serum by polymerase chain reaction amplification and microtiter sandwich hybridization. *J Clin Microbiol* 28: 1141-1146.
 - Khalifa KS, Roth A, Roth B, Arasteh KN, Janitschke K. 1994. Value of PCR for evaluating occurrence of parasitemia in immunocompromised patients with cerebral and extracerebral toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 32: 2813-2819.
 - Kimura M, Miyake H, Kim HS, Tanabe M, Arai M, Kawai S *et al.* 1995. Species specific PCR detection malaria parasites by microtiter plate hybridation: clinical study with malaria patients. *J Clin Microbiol* 33: 2342-2346.
 - Kitada K, Oka S, Kimura S, Shimada K, Nakamura Y. 1991. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by 5S ribosomal DNA amplification. *J Protool* 38: 90S-91S.
 - Kitchin PA, Szotyiori Z, Fromholc C, Almond N. 1990. Avoidance of false positives. *Nature* 334: 201.
 - Knerer B, Hayde M, Gratz G, Bernaschek G, Strobl W, Pollak A. 1995. Direct detection of *Toxoplasma gondii* with polymerase chain reaction in diagnosis of fetal *Toxoplasma* infection. *Wien Klin Wochenschr* 107: 137-140.
 - Koskiniemi M, Piiparinen H, Mannonen L, Rantalaho T, Vaheri A. 1996. Herpes encephalitis is a disease of middle aged and elderly people: polymerase chain reaction for detection of herpes simplex virus in the CSF of 516 patients with encephalitis. The Study Group. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 60: 174-178.
 - Kox FF, Rhiendthong D, Medo Miranda A, Udomsantisuk N, Ellis K, van Leeuwen J *et al.* 1994. A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Clin Microbiol* 32: 672-678.
 - Kristiansen BE, Ask E, Jenkius A, Fermer C, Randstrom P, Skold O. 1991. Rapid diagnosis of meningococcal meningitis by polymerase chain reaction. *Lancet* 337: 1568-1569.

- Kuppeveld FJ, Johansson KE, Galama JM, Kissing J, Bolske G, Hjelm E, Logt JT, Melchers WJ. 1994. 16S rRNA based polymerase chain reaction compared with culture and serological methods for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 13: 401-405.
- Kwok S, Higuchi R. 1989. Avoiding false positives with PCR. Nature 339: 237-238.
- Lamoril J, Molina JM, Gouvello A, Garin YJ, Deybach JC, Modai J, Derouin F. 1996. Detection by PCR of *Toxoplasma gondii* in blood in the diagnosis of cerebral toxoplasmosis in patients with AIDS. J Clin Pathol 49: 89-92.
- Langraf A, Reckmann B, Pingoud A. 1991. Direct analysis of polymerase chain reaction products using enzyme-linker immunosorbent assay techniques. Anal Biochem 198: 86-91.
- Langraf A, Reckmann B, Pingoud A. 1991. Quantitative analysis of polymerase chain reaction (PCR) products using primers labeled with biotin and a fluorescent dye. Anal Biochem 193: 231-235.
- Laskay T, Miko TL, Negesse Y, Solbach W, Rollinghoff M, Frommel D. 1995. Detection of cutaneous *Leishmania* infection in paraffin-embedded skin biopsies using the polymerase chain reaction. Trans R Soc Trop Med Hyg 89: 273-275.
- Leibovitz D, Pollack H, Moore T, Papellas J, Gallo L, Krasinski K, Borkowsky W. 1995. Comparison of PCR and standard cytological staining for detection of *Pneumocystis carinii* from respiratory specimens from patients with or at high risk for infection by HIV. J Clin Microbiol 33: 3004-3007.
- Leong DU, Greisen KS. 1993. PCR detection of bacteria found in cerebrospinal fluid. En: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds), Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and applications, pp. 300-306. ASM Press, Washington, USA.

-
- Liesnard C, De Wit L, Motte S, Brancart F, Content J. 1994. Rapid diagnosis of Cytomegalovirus lung infection by DNA amplification in bronchoalveolar lavages. *Mol Cell Probes* 8: 273-283.
 - Lin L, Gong Y, Cimino GD, Hearst JE, Isaacs ST. 1990. Two novel, rapid, high yield sample preparation methods for the PCR. *Abstr. 5th Conf Nucleic Acids*.
 - Lina B, Pozzetto B, Andreotti L, Beguier E, Bourlet T *et al.* 1996. Multicenter evaluating of a commercially available PCR assay for diagnosing enterovirus infection in a panel of cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Microbiol* 34: 3002-3006.
 - Lindsay DS, Abraham WH, Fallon RJ. 1994. Detection of mip gene by PCR for diagnosis of Legionnaires disease. *J Clin Microbiol* 32: 3068-3069.
 - Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. 1990. Use of uracil DNA glycosilase to control carry-over contamination in polymerase chain reaction. *Gene* 93: 125-128.
 - Loutit JS, Tompkins LS. 1990. Detection of *Legionella dumoffii* in water by DNA amplification and hybridation. *Program. Abstr. 30th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother.*
 - Lu JJ, Chen CH, Bartlett MS, Smith JW, Lee CH. 1995. Comparison of six different PCR methods for detection of *Pneumocystis carinii*. *J Clin Microbiol* 33: 2785-2788.
 - Luneberg E, Jensen JS, Frosch M. 1993. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by polymerase chain reaction and nonradioactive hybridization in microtiter plates. *J Clin Microbiol* 31: 1088-1094.
 - Maass M, Dalkoff K. 1994. Comparison of sample preparation methods for detection of *Chlamydia pneumoniae* in bronchoalveolar lavage fluid by PCR. *J Clin Microbiol* 32: 2616-2619.
 - Macario A, Conway E. 1990. *Gene Probes for Bacteria*. Academic Press, San Diego, California, USA.

-
- Magill AJ, Grogl M, Gasser RA, Oster CN. 1993. Visceral infection caused by *Leishmania tropica* in veterans of Operation Desert Storm. *N Engl J Med* 328: 1383-1387.

 - Maher M, Glennon M, Martinazzo G, Turcheti E, Marcolini S, Smith T Dawson MT. 1996. Evaluation of a novel PCR-based diagnostic assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples. *J Clin Microbiol* 34: 2307-2308.

 - Maiwald M, Schill M, Stockinger C, Helbig JH, Luck PC, Witzleg W *et al.* 1995. Detection of *Legionella* DNA in human and guinea pig urine samples by the polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 14: 25-33.

 - Mantero G, Zonaro A, Albertini A, Bertolo P, Primin D. 1991. DNA enzyme immunoassay: general method for detecting products of polymerase chain reaction. *Clin Chem* 37: 422-429.

 - Marko MA, Chipperfield R, Birnboim HC. 1982. A procedure for large scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder. *Anal Biochem* 121: 382-387.

 - Marmion BP, Williamson J, Worswick DA, Kok TW, Harris RJ. 1993. Experience with newer techniques for the laboratory detection of *Mycoplasma pneumoniae* infection: Adelaide, 1978-1992. *Clin Infect Dis* 17: S90-99.

 - Mathiopoulos K, Bouare M, McConkey G, McCutchan T. 1993. PCR detection of *Plasmodium* species in blood and mosquitoes. En: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds), *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and applications*. pp. 462-467. ASM Press, Washington, USA.

 - McHale RH, Stapleton PM, Bergquist PL. 1991. Rapid preparation of blood and tissue samples for polymerase chain reaction. *Bio Techniques* 10: 20-22.

 - McOmish F, Yap PL, Jordan A, Hart H, Cohen BJ, Simmonds P. 1993. Detection of Parvovirus B19 in donated blood: a model system for screening by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 31: 323-328.

- Meier A, Persing DH, Finken M, Bottger EC. 1993. Elimination of contaminating DNA within polymerase chain reaction reagent: implications for a general approach to detection of uncultured pathogens. *J Clin Microbiol* 31: 646-652.
- Melnick JL. 1990. *Virology*, 2nd ed. Raven Press, New York, USA.
- Meyer T, Reischl U, Wolf H, Schuller C, Arndt R. 1994. Identification of active Cytomegalovirus infection by analysis of immediate-early, early and late transcripts in peripheral blood cells of immunodeficient patients. *Mol Cell Probes* 8: 261-271.
- Miller MJ, Bovey S, Pado K, Bruckner DA, Wagar EA. 1994. Application of PCR in multiple specimen types for diagnosis of Cytomegalovirus infection: Comparison with cell culture and Shell Vial Assay. *J Clin Microbiol* 32: 5-10.
- Miorner H, Sjobring U, Nayak P, Chandramuki A. 1995. Diagnosis of tuberculous meningitis: a comparative analysis of 3 immunoassays, an immune complex assay and the polymerase chain reaction. *Tuber Lung Dis* 76: 381-386.
- Moine P, Vercken JB, Chastang C, Gajdos P *et al.* 1994. Severe community-acquired pneumonia. Etiology, epidemiology and prognosis factors. *Chest* 105: 1487-1495.
- Moore DF, Curry JJ. 1995. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by Amplicor PCR. *J Clin Microbiol* 33: 2686-2691.
- Mullis KB. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 262: 56-65.
- Muñoz R, Coffey TJ, Daniels M, Dowson CG, Laible G, Casal J *et al.* 1991. Intercontinental spread of a multiresistant clone of serotype 23 F *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 164: 302-306.
- Murray PE, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. 1995. *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington, USA.

- Musher DM, Spindel SJ, 1996. Community-acquired pneumonia. En: Remington JS, Swartz MN (eds), Current clinical topics in infectious disease, pp. 102-124. Blackwell Sci Publ, New York, USA.
- Musiani M, Azzi A, Zerbini M, Gibellini D, Venturoli S, Zakrzewska K, Re MC, Gentilomi G. 1993. Nested polymerase chain reaction assay for the detection of B19 Parvovirus DNA in human immunodeficiency virus patients. J Med Virol 40: 157-160.
- Nakamura Y. 1993. PCR detection of *Pneumocystis carinii*: diagnosis and therapeutic monitoring. En: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds), Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and applications, pp. 437-440. ASM Press, Washington, USA.
- Nelson CT, Ista AS, Wilkerson MK, Demmler GJ. 1995. PCR detection of Cytomegalovirus DNA in serum as a diagnostic test for congenital Cytomegalovirus infection. J Clin Microbiol 33: 3317-3318.
- Ni H, Knight AI, Cartwright K, Palmer WH, McFadden J. 1992. Polymerase chain reaction for diagnosis of meningococcal meningitis. Lancet. 340: 1432-1434.
- Nikkari S, Ekblad U. 1995. A rapid and safe method to detect fetal Parvovirus B19 infection in amniotic fluid by polymerase chain reaction: report of a case. Am J Perinatol 12: 447-449.
- Nogués A, Falguera M, Ruiz A, García M, Barber Y, Puig T, Rivas C. 1995. Incidencia de *Chlamydia pneumoniae* en la neumonía de adquisición comunitaria en el area de Lleida. VI Reunión Nacional de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Sitges (Barcelona).
- Nogués A, García M, Ribelles E, Rivas C. 1993. Toxoplasmosis aguda. Diagnóstico de laboratorio. Enf Infec Microbiol Clin 11: 16-19.
- Nogués A, García M, Rivas C, Ruiz A, Falguera M, Puig T. 1995. Valoración de la especificidad en la detección de antígeno capsular de *Streptococcus pneumoniae* sobre

muestras clínicas utilizando la reacción en cadena de la polimerasa como técnica de referencia. *Enf Infec Microbiol Clin* 13: 288-291.

- Numazaki K, Chiba S. 1996. PCR detection of Cytomegalovirus DNA in serum as test for congenital Cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol* 34: 1871-1872.

- Nuzum E, White F, Thakur C, Dietza R, Wages J, Grogl M *et al.* 1995. Diagnosis of symptomatic visceral leishmaniasis by use of polimerase chain reaction on patient blood. *J Infec Dis* 171: 751-754.

- O'Leary TJ, Tsai MM, Wright CF, Cushion MT. 1995. Use of semiquantitative PCR to assess onset and treatment of *Pneumocystis carinii* infection in rat model. *J Clin Microbiol* 33: 718-724.

- Olsson M, Elvin K, Lofdahl S, Linder E. 1993. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in sputum and bronchoalveolar lavage samples by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 31: 221-226.

- Ortquist A, Hedlund J, Grillner L, Jalonen E, Kallings I, Leinonen M. 1990. Etiology, outcome and prognostic factors in community-acquired pneumonia requiring hospitalization. *Eur Respir J* 3: 1105-1113.

- Ouchi K, Nakazawa T, Karita M, Kanehara Y. 1994. Prevalence of *Chlamydia pneumoniae* in acute lower respiratory infection in the pediatric population in Japan. *Acta Paediatr Jpn* 36: 256-260.

- Ozono K, Mushiake S, Takeshima T, Nakayama M. 1997. Diagnosis of congenital cytomegalovirus infection by examination of placenta: application of polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Pediatr Pathol Lab Med* 17: 249-258.

- Parmley SF, Goebel FD, Remington JS. 1992. Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid of AIDS patients by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30: 3000-3002.

-
- Patel R, Smith TF, Espy M, Portela D, Wiesner RH, Krom RA, Paya CV. 1995. A prospective comparison of molecular diagnostic techniques for the early detection of Cytomegalovirus in liver transplant recipients. *J Infect Dis* 171: 1010-1014.
 - Peiris JS, Taylor CE, Main J, Graham K, Madeley CR. 1995. Diagnosis of Cytomegalovirus (CMV) disease in renal allograft recipients: the role of semiquantitative polymerase chain reaction (PCR). *Nephrol Dial Transplant* 10: 1198-1205.
 - Perez JE, Ogasuku E, Inga R, Lopez M, Monje J, Paz L, Nieto E, Arevalo J, Guerra H. 1994. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp. in Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88: 161-164.
 - Persing D H. 1996. PCR Protocols for Emerging Infectious Diseases. ASM Press, Washington, USA.
 - Persing DH. 1991. Polymerase chain reaction: trenches to benches. *J Clin Microbiol* 29: 1281-1285.
 - Persing DH, Smith TF, Tenover FC. 1993. Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and applications. ASM Press, Washington, USA.
 - Peter JB. 1991. The polymerase chain reaction: amplifying our options. *Rev Infect Dis* 13: 166-171.
 - Pfyffer GE, Kissling P, Jahn EM, Welscher HM, Salfinger M, Weber R. 1996. Diagnostic performance of amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test with cerebrospinal fluid, other non respiratory, and respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 34: 834-841.
 - Pierre C, Lecossier D, Boussougant Y, Bocart D, Joly V, Yeni P, Ance AJ. 1991. Use of a reamplification protocol improves sensitivity of detection *M. tuberculosis* in clinical samples by amplification of DNA. *J Clin Microbiol* 29: 712-717.
 - Pring-Akerblom P, Adrian T. 1994. Type and group specific polymerase chain reaction for adenovirus detection. *Res Virol* 145: 23-35.

-
- Prosch S, Kimel V, Dawydowa I, Kruger DH. 1992. Monitoring of patients for Cytomegalovirus after organ transplantation by centrifugation culture and PCR. *J Med Virol* 38: 246-251.
- Pruck PM, Aspöck C, Makristhatis A, Rotter ML, Wank H, Willinger B, Hirsch AM. 1995. Polymerase chain reaction for detection of *Chlamydia pneumoniae* in gargled-water specimens of children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 14: 141-144.
- Ramírez JA, Ahkee S, Tolentino A, Miller RD, Summersgill JT. 1996. Diagnosis of *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* or *Chlamydia pneumoniae* lower respiratory infection using the polymerase chain reaction on a single throat swab specimen. *Diagn Microbiol Infect Dis* 24: 7-14.
- Querol JM, Farga MA, Granda D, Gimeno C, García de Lomas J. 1995. The utility of PCR in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Chest* 107: 1631-1635.
- Radstrom P, Backman A, Qian N, Kragstjerg P, Pahlson C, Olcen P. 1994. Detection of bacterial DNA in cerebrospinal fluid by an assay for simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and Streptococci using a seminested PCR strategy. *J Clin Microbiol* 32: 2738-2744.
- Rand KH, Pollard RB, Merigan TC. 1978. Increased pulmonary superinfections in cardiac transplant patients undergoing primary cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 298: 951.
- Relman DA, Falkow S. 1992. Identification of uncultured microorganisms: expanding the spectrum of characterized microbial pathogens. *Infect Agents Dis* 1: 245-253.
- Richardson EP. 1961. Progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med* 265: 815-823.
- Richeldi L, Barnini S, Saltini C. 1996. Molecular diagnosis of tuberculosis. *Eur Respir J Suppl* 20: 689s-700s.

-
- Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. 1990. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol* 71: 267-275.
 - Rogers BB, Mak SK, Covill LQ. 1991. Detection of Parvovirus by DNA analysis. *R I Med J* 74: 13-16.
 - Ronai Z, Yakubovskaya M. 1995. PCR in clinical diagnosis. *J Clin Lab Anal* 9: 269-283.
 - Rotbart H, Romero JR. 1993. PCR detection of the human enteroviruses. En: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds), *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and applications*, pp. 401-406. ASM Press, Washington, USA.
 - Rotbart HA. 1990. Enzymatic RNA amplification of enteroviruses. *J Clin Microbiol* 28: 438-442.
 - Rotbart HA, Sawyer MH, Fast S, Lewinski C, Murphy N, Keyser EF *et al.* 1994. Diagnosis of enteroviral meningitis by using PCR with a colorimetric microwell detection assay. *J Clin Microbiol* 32: 2590-2592.
 - Rotbart HA. 1990. Diagnosis of enteroviral meningitis with the polymerase chain reaction. *J Pediatr* 117: 85-89.
 - Roux P, Lavrard I, Poirot JL, Chouaid C, Denis M, Olivier JL. *et al.* 1994. Usefulness of PCR for detection of *Pneumocystis carinii* DNA. *J Clin Microbiol* 32: 2324-2326.
 - Rowley AH, Whitley RJ, Lakeman FD, Wolinsky SM. 1990. Rapid detection of herpes simplex virus DNA in cerebrospinal fluid of patients with herpes simplex encephalitis. *Lancet* 335: 440-441.
 - Rowley AH, Wolinsky SM, Sambol SP, Barkholt L, Ehrnst A, Andersson JP. 1991. Rapid detection of Cytomegalovirus DNA and RNA in blood of renal transplant patients by in vitro enzymatic amplification. *Transplantation* 51: 1028-1033.

-
- Rozenberg F, Lebon P. 1991. Amplification and characterization of Herpesvirus DNA in cerebrospinal fluid from patients with acute encephalitis. *J Clin Microbiol* 29: 2412-2417.
 - Rudolph KM, Parkinson AJ, Black CM, Mayer LW. 1993. Evaluation of polymerase chain reaction for diagnosis of pneumococcal pneumonia. *J Clin Microbiol* 31: 2661-2666.
 - Rueckert RR. 1990. Picornavirus and their replication. In: Field BN, Knipe DM. (eds), *Virology*, pp. 507-548. Raven Press, New York, USA.
 - Rys PN, Persing DH. 1993. Preventing false positives: quantitative evaluation of three protocols for inactivation of polymerase chain reaction amplification products. *J Clin Microbiol* 31: 2356-2360.
 - Sabine Y, Grevais A, Simone V, Cafilisch M, Perrin L, Wunderli W. 1996. Rapid and sensitive detection of Enterovirus in specimens from patients with aseptic meningitis. *J Clin Microbiol* 34: 199-201.
 - Safrin S, Shaw H, Bolan G, Cuan J, Chiang CS. 1997. Comparison of virus culture and the polymerase chain reaction for diagnosis of mucocutaneous herpes simplex virus infection. *Sex Transm Dis* 24: 176-180.
 - Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA *et al.* 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for the diagnosis of sickle-cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
 - Salfinger M, Pfyffer GE. 1994. The new diagnostic Mycobacteriology laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13: 961-979.
 - Salo P, Ortqvist A, Leinonen M. 1995. Diagnosis of bacteremic pneumococcal pneumonia by amplification of pneumolysin gene fragment in serum. *J Infect Dis* 171: 479-482.
 - Sambrook J, Fritsch GM, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York, USA.

-
- Sariola H. 1993. Polymerase chain reaction from fiction to fact and from fact to fiction. *Duodecim* 109: 2195-2196.
 - Savey L, Poissonnier MH, Leblanc M, Colau JC. 1995. Parvovirus B19 infection and pregnancy. *J Gynecol Obstet Biol Reprod Paris* 24: 170-176.
 - Sawyer MH, Holland D, Aintablian N, Connor JD, Keyser EF, Waecker NJ Jr. 1994. Diagnosis of enteroviral central nervous system infection by polymerase chain reaction during a large community outbreak. *Pediatr Infect Dis J* 13: 177-182.
 - Schafer P, Braun RW, Mohring K, Henco K, Kang J, Wendland T, Kuhn JE. 1993. Quantitative determination of human Cytomegalovirus target sequences in peripheral blood leukocytes by nested polymerase chain reaction and temperature gradient gel electrophoresis. *J Gen Virol* 74 : 2699-2707.
 - Schirm J, Oostendorp LAB, Mulder JG. 1995. Comparison of amplicor, in-house PCR, and conventional culture for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Clin Microbiol* 33: 3221-3224.
 - Schluger N, Sepkowitz K, Armstrong D, Bernard E, Rifkin M, Cerami A, Bucala R. 1991. Detection of *Pneumocystis carinii* in serum of AIDS patients with *Pneumocystis* pneumonia by the polymerase chain reaction. *J Protozool* 38: 240S-242S.
 - Schluger NW, Kinney D, Harkin TJ, Rom WN. 1994. Clinical utility of the polymerase chain reaction in the diagnosis of infections due to *Mycobacterium tuberculosis*. *Chest* 105: 1116-1121.
 - Schwarz TF, Jager G, Holzgrève W, Roggendorf MI. 1992. Diagnosis of human Parvovirus B19 infections by polymerase chain reaction. *Scand J Infect Dis* 24: 691-696.
 - Sevall JS, Ritenhous J, Peter JB. 1992. Laboratory diagnosis of Parvovirus B19 infection. *J Clin Lab Anal* 6: 171-175.
 - Silverman L, Rubinstein J. 1965. Electron microscopic observations on a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Science* 148: 1477-1479.

-
- Siritantikorn S, Nantharukchaikul S, Chavalidthamrong P, Sutthent R, Wasi C, Thongcharoen P. 1994. Detection of human Cytomegalovirus in urine of infants by polymerase chain reaction. *J Med Assoc Thai* 77: 414-420.
 - Skakni L, Sardet A, Just J, Landman J, Costil J, Moniot N, *et al.* 1992. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples from pediatric patients by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30: 2638-2643.
 - Skoldenberg B. 1991. Herpes simplex encephalitis. *Scand J Infect Dis Suppl* 80: 40-46.
 - Smith KT, Long CM, Bowman B, Manos MM. 1990. Using cosolvents to enhance PCR amplifications. *Amplifications* 1: 16-17.
 - Smith KC, Starke JR, Eisenach K, Ong LT, Denby M. 1996. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens from children using a polymerase chain reaction. *Pediatrics* 97: 155-160
 - Smith KL, Dunstan RA. 1993. PCR detection of Cytomegalovirus: a review. *Br J Haematol* 84: 187-190.
 - Stanier P, Kitchen AD, Taylor DL, Tyms AS. 1992. Detection of human Cytomegalovirus in peripheral mononuclear cells and urine samples using PCR. *Mol Cell Probes* 6: 51-58.
 - Starnbach MN, Falkow S, Tompkins LS. 1989. Species-specific detection of *Legionella pneumophila* in water by DNA amplification and hybridization. *J Clin Microbiol* 27: 1257-1261.
 - Studahl M, Bergstrom T, Ekeland-Sjoberg K, Ricksten A. 1995. Detection of Cytomegalovirus DNA in cerebrospinal fluid in immunocompetent patients as a sign of active infection. *J Med Virol* 46: 274-280.
 - Tamburrini E, Mencarini P, De Luca A, Antinori A, Visconti E, Ammassari A *et al.* 1993. Simple and rapid two-step polymerase chain reaction for diagnosis of *Pneumocystis carinii* infection. *J Clin Microbiol* 31: 2788-2789.

-
- Tamburrini E, Mencarini P, Visconti E, Zolfo M, Luca A, Siracusano A, *et al.* 1996. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in blood by PCR is not value for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. J Clin Microbiol 34: 1586-1588.
 - Telenti A, Aksamit A.J, Proper J, Smith F. 1990. Detection of JC virus DNA by polymerase chain reaction in patients with profressive multifical leukoencephalopathy. J Infect Dis 162: 858-861.
 - Thiele D. 1991. The "polymerase chain reaction" (PCR) and its possible applications. Immun Infekt 19: 138-142.
 - Thomas CA, Smith SE, Morgan TM, White WL, Feldman SR. 1994. Clinical application of polymerase chain reaction amplification to diagnosis of Herpes virus infection. Am J Dermatopathol 16: 268-274.
 - Thornton CG, Hartley JL, Rashtchian A. 1992. Utilizing uracil DNA glycosilase to control carryover contamination in PCR: characterization of residual UDG activity following thermal cycling. BioTechniques 13: 180-182.
 - Thulliez P, Daffos F, Forestier F. 1992. Diagnosis of *Toxoplasma* infection in the pregnant woman and the unborn child: current problems. Scand J Infect Dis Suppl 84: 18-22.
 - Torok TJ, Wang QY, Gary GW Jr, Yang CF, Finch TM, Anderson LJ. 1992. Prenatal diagnosis of intrauterine infection with Parvovirus B19 by the polymerase chain reaction technique. Clin Infect Dis 14: 149-155.
 - van Ketel RS, de Weber B, van Alphen L. 1990. Detection of *Haemophilus influenzae* in cerebrospinal fluids by polymerase chain reaction DNA amplification. J Med Microbiol 33: 271-276.
 - Ven E, Melchers W, Galama J, Camps W, Meuwissen J. 1991. Identification of *Toxoplasma gondii* infections by BI gene amplification. J Clin Microbiol 29: 2120-2124.

-
- Victor T, du Toit R, van Helden PD. 1992. Purification of sputum samples through saccharose improves detection of *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 30: 1514-1517.
 - Villa E, Buttafoco P, Grottola A, Merighi AL, Ferretti I. 1995. The polymerase chain reaction (PCR). Its significance and limits. Minerva Gastroenterol Dietol 41: 7-9.
 - Vogelstein B, Gillespie D. 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc Natl Acad Sci USA. 76: 615-619.
 - Wang JT, Wang TH, Sheu JC, Lin SM, Lin JT, Chen DS. 1992. Effects of anticoagulants and storage of blood samples on efficacy of the polymerase chain reaction assay for hepatitis C virus. J Clin Microbiol 30: 750-753.
 - Waters PS, McCutchan TF. 1989. Rapid, sensitive diagnosis of malaria based on ribosomal RNA. Lancet 334: 1343-1346.
 - Weber B, Nestler U, Ernst W, Rabenau H, Braner J, Birkenbach A, Scheuermann EH, Schoeppe W, Doerr HW. 1994. Low correlation of human Cytomegalovirus DNA amplification by polymerase chain reaction with cytomegalovirus disease in organ transplant recipients. J Med Virol 43: 187-193.
 - Weig M, Klinker H, Bogner B, Meier A, Gross U. 1997. Usefulness of PCR for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in different patients groups. J Clin Microbiol 35: 1445-1449.
 - Wiedbrauk DL, Werner JC, Drevon AM. 1995. Inhibition of PCR by aqueous and vitreous fluids. J Clin Microbiol 33: 2643-2646.
 - Wilden S, Chonmaitre T. 1987. The importance of the viral laboratory in the diagnosis and management of viral meningitis. Am J Dis Child 141: 454-457.
 - Williamson J, Marmion BP, Worswick DA, Kok W, Tannock G, Herd R, Harris R. 1992. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. 4. Antigen capture and PCR-gene amplification for detection of the *Mycoplasma*: problems of clinical correlation. Epidemiol Infect 109: 519-537.

-
- Wolf DG, Spector SA. 1992. Diagnosis of human Cytomegalovirus central nervous system disease in AIDS patients by DNA amplification from cerebrospinal fluid. *J Infect Dis* 166: 1412-1415.
 - Woodhead MA, Macfarlane JT, Mc Cracken JS, Rose DH, Finch RG. 1987. Prospective study of the etiology and outcome of pneumonia in the community. *Lancet* 332: 671-674.
 - Xu LZ, Larzul D. 1991. The polymerase chain reaction: basic methodology and applications. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 14: 209-221.
 - Xu W, Sundqvist VA, Brytting M, Linde A. 1993. Diagnosis of Cytomegalovirus infections using polymerase chain reaction, virus isolation and serology. *Scand J Infect Dis* 25: 311-316.
 - Yamada S. 1995. *Chlamydia pneumoniae* infection in children with lower respiratory tract infections. *Kurume Med J* 42: 107-120.
 - Yamakawa Y, Oka H, Hori S, Arai T, Izumi R. 1995. Detection of human Parvovirus B19 DNA by nested polymerase chain reaction. *Obstet Gynecol* 86: 126-129.
 - Yang RCA, Lis J, Wu B. 1979. Elution of DNA from agarose gels after electroforesis. *Methods Enzymol* 65: 176-182.
 - Yoto Y, Kudoh T, Haseyama K, Suzuki N, Oda T, Katoh T, Takahashi T, Sekiguchi S, Chiba S. 1995. Incidence of human Parvovirus B19 DNA detection in blood donors. *Br J Haematol* 91: 1017-1018.
 - Zabala DC, Schoell JE. 1981. Ultraphin needle aspiration of the lung in infectious and malignant disease. *Am Rev Respir Dis* 123: 125-131.
 - Zakrzewska K, Azzi A, Patou G, Morfini M, Rafanelli D, Pattison JR. 1992. Human Parvovirus B19 in clotting factor concentrates: B19 DNA detection by the nested polymerase chain reaction. *Br J Haematol* 81: 407-412.

- Zandotti C, Lamballeri X, Guignole C, Bollet C, Micco P. 1993. A rapid DNA extraction method from culture and clinical samples. Suitable for the detection of human cytomegalovirus by polymerase chain reaction. *Act Virol* 37: 106-108.

- Zazzi M, Romano L, Brasini A, Valensin P. 1992. Low human immunodeficiency virus titer and polymerase chain reaction false-negatives. *J Infect Dis* 164: 779-780.

- Zhang Y, Isaacman DJ, Wadowsky RM, White JR, Post JC, Ehrlich GD. 1995. Detection of *Streptococcus pneumoniae* in whole blood by PCR. *J Clin Microbiol* 33: 596-601.

- Zipeto D, Revello MG, Silini E, Parea M, Percivalle E, Zavattoni M *et al.* 1992. Development and clinical significance of a diagnostic assay based on the polymerase chain reaction for detection of Human Cytomegalovirus DNA in blood samples from immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* 30: 527-530.

- Zipeto D, Baldanti F, Zella D, Furione M, Cavicchini A, Milanesi G, Gerna G. 1993. Quantification of human Cytomegalovirus DNA in peripheral blood polymorphonuclear leukocytes of immunocompromised patients by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 44: 45-55.

H) ANEXO

Se adjuntan las publicaciones sobre la utilidad de la PCR en el diagnóstico microbiológico, generadas durante la realización de este estudio.

Detección de *Pneumocystis carinii* en muestras clínicas por la reacción en cadena de la polimerasa. Comparación con la técnica de metenamina de plata

Antonio Nogués, Mercedes García, Carmen Rivas, Miguel Falguera*, Teresa Puig* y Agustín Ruiz*

Servicios de Análisis Clínicos y Microbiología, y *Medicina Interna. Hospital Arnau de Vilanova. Universidad de Lérida. Lérida.

FUNDAMENTO: Valorar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en el diagnóstico de infección por *Pneumocystis carinii* en enfermos inmunodeprimidos, comparándola con los resultados obtenidos por la tinción de metenamina de plata.

MÉTODOS: Hemos estudiado 25 muestras clínicas (10 esputos inducidos, 12 aspirados transtorácicos y 2 lavados broncoalveolares) de 17 pacientes afectados de sida y con sintomatología respiratoria. En la amplificación de ADN hemos utilizado 2 cadenas de oligonucleótidos que amplifican una larga secuencia mitocondrial ADN_r del genoma de *P. carinii*.

RESULTADOS: La sensibilidad de la reacción en cadena de la polimerasa sobre muestras clínicas fue del 92,8 %, con una especificidad del 100 %, valor predictivo positivo del 100 % y negativo del 92,3 %. La tinción de plata nos dio una sensibilidad del 65 %, especificidad del 100 %, valor predictivo positivo del 100 % y negativo del 63 %.

CONCLUSIÓN: La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa se muestra más sensible que la tinción de plata en la detección de *Pneumocystis carinii* en pacientes con neumonía, por lo que creemos puede ser una buena alternativa a los métodos clásicos en muchos laboratorios de microbiología.

Palabras clave: *Pneumocystis carinii*. Reacción en cadena de la polimerasa. Tinción metenamina de plata.

Correspondencia: Dr. A. Nogués Blau.
Rovira Roure, 5, 3º 1º
25006 Lérida.

Manuscrito recibido el 30-12-1992 y aceptado el 28-1-1993.

Detection of *Pneumocystis carinii* in clinical specimens by polymerase chain reaction. Comparison with methenamine silver stain

BACKGROUND: A comparison of polymerase chain reaction (PCR) with methenamine silver stain was performed on clinical specimens for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunosuppressed patients.

METHODS: 25 clinical samples (10 induced sputa, 12 transthoracic needle aspirations and 2 bronchoalveolar lavages) from 17 patients with AIDS and respiratory symptoms were studied. We performed DNA amplification by using 2 primers that amplify the mitochondrial large rDNA sequence of *P. carinii*.

RESULTS: The sensitivity and specificity of the PCR technique were 92.8 % and 100 % respectively, with a positive predictive value of 100 % and negative predictive value of 92.3 %.

The sensitivity of the silver stain were 65 %, specificity 100 %, positive predictive value 100 % and negative predictive value 63 %.

CONCLUSION: The PCR technique is more sensitive than the methenamine silver stain for detecting *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens from patients with pneumonia. Consequently it could be a very good alternative to classical methods in diagnosis of *P. carinii* infections.

Key words: *Pneumocystis carinii*. Polymerase chain reaction. Methenamine silver stain.

Introducción

La neumonía por *Pneumocystis carinii* en enfermos de sida es extraordinariamente frecuente¹, disponiéndose en la actualidad de muchos métodos microbiológicos para hacer un diagnóstico rápido y fiable. Estos métodos van desde las clásicas tinciones de Giemsa o metenamina de plata (con sus múltiples variaciones) hasta las más modernas técnicas de inmunofluorescencia directa o indirecta con anticuerpos monoclonales, quimiofluorescencia², técnicas de hibridación *in situ*³ y técnicas de amplificación de ADN^{4,5}.

Suelen ser varios los parámetros que influyen en la decisión de elegir uno u otro de estos métodos: sensibilidad, especificidad, coste, sencillez de ejecución, tiempo disponible, etc.⁷

Por otra parte la sensibilidad de algunas de estas técnicas varía, según los diferentes autores⁸⁻¹⁰, dependiendo del tipo y calidad de la muestra, así como del tiempo que el microbiólogo puede dedicar a la observación microscópica (entre 10 y 15 minutos en el caso de las tinciones).

En el presente estudio valoramos la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el diagnóstico de la infección por *P. carinii* en enfermos inmunodeprimidos, comparándola con los resultados obtenidos por la tinción de metenamina de plata.

Material y métodos

Hemos estudiado 25 muestras correspondientes a 17 pacientes afectados de sida; 10 de estas muestras eran espusos inducidos, 12 aspirados pulmonares obtenidos por punción transtorácica y 2 secreciones respiratorias obtenidas por lavado bronquial. Todos los pacientes presentaban sintomatología respiratoria de vías bajas.

Una vez recibidas en nuestro laboratorio, las muestras eran fraccionadas convenientemente según las diferentes determinaciones que se solicitaban. Una parte era reservada para PCR y otra era enviada al servicio de anatomía patológica para la tinción de plata.

Preparación de la muestra para la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa

La extracción de ADN de la muestra la realizamos mediante un equipo comercial (Kit Extracción DNA IV), fabricado por Durviz SL (Valencia, España) y distribuido por Unipath SA, y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tomamos 1,5 ml de muestra y realizamos 3 lavados con agua destilada estéril centrifugando a 13.000 rpm durante 5 minutos. A continuación resuspendimos el sedimento con 283 μ l de tampón de dilución, transferimos a un tubo con polímero y añadimos 16 μ l de solución de detergente y 1,5 μ l de enzima proteolítica, incubando durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente añadimos 50 μ l de solución salina y 40 de solución de precipitación, incubando durante 10 minutos a 65 °C. En un siguiente paso añadimos al tubo 400 μ l de solución de extracción, mezclamos y centrifugamos 5 mi-

nutos a 13.000 rpm para separar la fase acuosa de ADN del resto de proteínas. Transferimos el sobrenadante a un tubo nuevo y añadimos 0,6 volúmenes de alcohol isopropílico para precipitar los ácidos nucleicos. Mantuvimos 10 minutos a temperatura ambiente y luego centrifugamos durante 10 minutos a 13.000 rpm, eliminando el sobrenadante por decantación. Lavamos el ADN con 1 ml de alcohol etílico al 70 %, decantamos y secamos el sedimento al vacío hasta evaporar totalmente el alcohol. A continuación, resuspendimos con 100 μ l de agua destilada estéril, procediendo a la amplificación del ADN.

Amplificación del ADN

La zona amplificada corresponde a una región genómica de ADN codificadora de ARN ribosómico mitocondrial de *P. carinii* de rata^{11,12}. Para su realización utilizamos el set de amplificación *P. carinii*, fabricado por Durviz SL (Valencia, España) y distribuido por Unipath SA, siguiendo las instrucciones del fabricante.

En un tubo colocamos 100 μ l de aceite antievaporación, 50 μ l de muestra y 50 de una mezcla compuesta por: 37,6 μ l de agua destilada estéril, 10 μ l de tampón de polimerización, 1 μ l de desoxinocleótidos trifosfato, 0,5 de los iniciadores 1 y 2 y 0,4 μ l de polimerasa. A continuación colocamos la muestra en un termociclador, efectuando 40 ciclos de 2 minutos a 94 °C, 1 minuto a 56 °C y 1 minuto a 72 °C.

La visualización del amplificado la hicimos por separación electroforética en un gel de agarosa al 3 % con bromuro de etidio incorporado y observando en un transiluminador de luz ultravioleta.

Resultados

De las 25 muestras estudiadas por PCR, en 12 (correspondientes a 9 pacientes) encontramos genoma de *P. carinii* (5 espusos, 6 punciones transtorácicas y un lavado broncoalveolar). La metenamina de plata se aplicó sobre 22 muestras, siendo positiva en 6 muestras, correspondientes a 4 pacientes (tabla 1).

Los 9 pacientes en los que se detectó genoma de *P. carinii* tenían neumonía por dicho agente causal según se demostró por la clínica, respuesta al tratamiento y evolución posterior. La metenamina de plata fue negativa en 5 de estos 9 pacientes.

La PCR nos permitió diagnosticar correctamente a todos los pacientes con infección por *P. carinii* ($p=0,001$) si bien en un paciente la PCR fue negativa aplicada sobre la punción pulmonar y positiva sobre el esputo (tabla 2). La tinción de plata nos dio el diagnóstico etiológico en 4 de los 9 pacientes ($p=0,05$) (tabla 3).

La sensibilidad de la PCR sobre las muestras clínicas fue del 92,8 %, con una especificidad del 100 %, un valor predictivo positivo del 100 % y un predictivo negativo del 92,3 %. La tinción de plata, en cambio, nos dio una sensibilidad del 65 %, especificidad del 100 %, valor predictivo positivo del 100 % y negativo del 63 %.

Discusión

Los datos anteriores nos confirman la superioridad de la PCR sobre la tinción de metenamina de plata en lo que refiere al diagnóstico de infección por *P. carinii*, apreciándose una mayor sensibilidad sobre cualquiera de los tipos de muestra estudiados. Tiene como

TABLA 1. Resultados de la reacción en cadena de la polimerasa y tinción metenamina de plata en los diferentes tipos de muestras

Paciente	Muestra	Resultado	
		PCR	TMP
1	EI	+	—
2	EI	+	—
	PTA	+	—
3	PTA	+	—
4	PTA	+	—
5	PTA	+	+
6	PTA	+	—
	EI	+	+
7	BAL	+	—
8	PTA	—	+
	EI	+	+
9	PTA	+	+
	EI	+	+
10	EI	—	NR
11	PTA	—	—
	EI	—	—
	EI	—	—
12	PTA	—	—
13	PTA	—	NR
14	PTA	—	—
	EI	—	—
15	PTA	—	—
	EI	—	—
16	EI	—	—
17	BAL	—	NR

PCR: reacción en cadena de la polimerasa; TMP: tinción metenamina de plata; PTA: punción transtorácica aspirativa; EI: esputo inducido; BAL: lavado broncoalveolar; NR: prueba no realizada.

TABLA 2. Resultados de la reacción en cadena de la polimerasa en relación con la presencia o no de infección por *P. carinii*

	Muestra de paciente infectado	Muestra de paciente no infectado	Total
PCR positiva	12	0	12
PCR negativa	1	12	13
Total	13	12	25

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

TABLA 3. Resultados de la tinción metenamina de plata en relación con la presencia o no de infección por *P. carinii*

	Muestra de paciente infectado	Muestra de paciente no infectado	Total
TMP positiva	6	0	6
TMP negativa	7	9	16
Total	13	9	22

TMP: tinción de metenamina de plata.

desventaja, en estos momentos, la mayor complejidad de ejecución y el mayor coste económico, inconvenientes que pueden verse superados con los actuales intentos de automatización de la PCR. Pero tiene la ventaja de la enorme potencia en el incremento de la sensibilidad y especificidad, y, en un laboratorio medio de microbiología, donde el microbiólogo debe responsabilizarse de múltiples y diferentes tareas es importante que la sensibilidad recaiga sobre la técnica más que sobre el tiempo de observación microscópica de la muestra, del cual el microbiólogo muchas veces no dispone.

En nuestra serie todos los casos positivos por PCR han tenido una buena correlación con la clínica y evolución del paciente, siendo éste el criterio que hemos utilizado para valorar los datos de sensibilidad y especificidad de las 2 técnicas utilizadas. Pero persiste el interrogante de cómo interpretar los resultados verdaderos positivos en aquellos pacientes sin enfermedad; es bien sabido que muchos adultos pueden ser portadores de *P. carinii* en pequeñas cantidades que pueden ser reveladas por PCR. ¿Es deseable, entonces, una técnica tan sensible? Probablemente la respuesta sea diferente según las circunstancias de cada laboratorio. Nosotros hemos optado por la PCR para el diagnóstico de infección por *P. carinii* después de haber probado múltiples técnicas. Los resultados discordantes entre esta técnica y la clínica (en nuestro caso no los ha habido pero puede haberlos) creemos deben ser interpretados a la luz de la clínica, según la evolución del paciente, teniendo siempre en cuenta el dato microbiológico aportado y actuando en consecuencia en el momento en que las circunstancias clínicas lo requieran.

Concluimos, pues, que la PCR es una técnica sensible y específica y que en muchos laboratorios de microbiología puede ser una buena alternativa a las técnicas clásicas para el diagnóstico de infección por *P. carinii* en enfermos inmunodeprimidos.

Bibliografía

- Fortun J, Hermida JM, Hernández-Cabrero J, Martí-Belda P, Sueiro A, Fogue L et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with HIV infection at spanish hospital. *Enf Infec Microbiol Clin* 1990; 8: 82-87.
- Baselski VS, Robison MK, Pifer LW, Woods DR. Rapid detection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage samples by using cellulofluor staining. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 393-394.
- Hayashi Y, Watanabe J, Nakata K, Fukayama M, Ikeda H. A novel diagnostic method of *Pneumocystis carinii*. *In situ* hybridization of ribosomal ribonucleic acid with biotinylated oligonucleotide probes. *Lab Invest* 1990; 63: 576-580.
- Kitada K, Oka S, Kimura S, Shimada K, Nakamura Y. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by 5S ribosomal DNA amplification. *J Protozool* 1991; 38: 90-91.

5. Kitada K, Oka S, Kimura S, Shimada K, Serikawa T, Yamada J et al. Detection of *Pneumocystis carinii* sequences by polymerase chain reaction: animal models and clinical application to noninvasive specimens. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1.985-1.990.
6. Schluger N, Sepkowitz K, Armstrong D et al. Detection of *Pneumocystis carinii* in serum of AIDS patients with *Pneumocystis* pneumonia by the polymerase chain reaction. *J Protozool* 1991; 38: 240-242.
7. Cregan P, Yamamoto A, Lum A, VanDerHeide TH, McDonald M, Pulliam L. Comparison of four methods for rapid detection of *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2.432-2.436.
8. Midgley J, Parsons PA, Shanson DC, Husain DA, Francis N. Monoclonal immunofluorescence compared with silver stain for investigating *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Clin Pathol* 1991; 44: 75-76.
9. Wolfson JS, Waldron MA, Sierra LS. Blinded comparison of a direct immunofluorescent monoclonal antibody staining method and a Giemsa staining method for identification of *Pneumocystis carinii* in induced sputum and bronchoalveolar lavage specimen of patients infected with human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2.136-2.138.
10. Ng VL, Yajko DM, McPhaul LW, Gartner I, Byford B, Goodman CD et al. Evaluation of an indirect fluorescent antibody stain for detection of *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 975-979.
11. Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S, Sinclair K, Miller RF. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet* 1990; 25: 451-453.
12. Wakefield AF, Guiver L, Miller RF, Hopkin JM. DNA amplification of induced sputum samples for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet* 1991; 337: 1.378-1.379.

Valoración de la especificidad en la detección de antígeno capsular de *Streptococcus pneumoniae* sobre muestras clínicas utilizando la reacción en cadena de la polimerasa como técnica de referencia

Antonio Nogués, Mercedes García, Carmen Rivas, Agustín Ruiz*, Miguel Falguera* y Teresa Puig*

Servicios de Análisis Clínicos-Microbiología y *Medicina Interna. Hospital Arnau de Vilanova. Universidad de Lleida. Lleida.

FUNDAMENTO: Estudiamos la sensibilidad y especificidad de la técnica de látex sobre muestras obtenidas por punción transtorácica aspirativa en el diagnóstico de la neumonía neumocócica, utilizando como técnica de referencia la reacción en cadena de la polimerasa.

MÉTODOS: Hemos seleccionado 29 muestras procedentes de otros tantos pacientes afectados de neumonía de adquisición extrahospitalaria procesándolas en paralelo para cultivo, detección de antígeno y reacción en cadena de la polimerasa. Para la técnica de látex utilizamos el kit de reactivos de BioMérieux (Francia) y para la reacción en cadena de la polimerasa utilizamos los *primers* (iniciadores) Pn2x up y Pn2x down que amplifican el gen PBP2x de *Streptococcus pneumoniae*.

RESULTADOS: El cultivo fue positivo en 5 pacientes, la detección de antígeno en 15 y la reacción en cadena de la polimerasa en 14. La especificidad de la técnica de látex, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa como referencia, fue del 93%.

CONCLUSIÓN: La técnica de látex para detección de antígeno neumocócico tiene una sensibilidad similar a la reacción en cadena de la polimerasa, posee una buena especificidad y es de rápida y fácil ejecución.

Palabras clave: *Streptococcus pneumoniae*.
Reacción en cadena de la polimerasa.
Detección de antígeno.

Evaluation of specificity of pneumococcal antigen detection in clinical samples by using the polymerase chain reaction as reference method

BACKGROUND: Sensitivity and specificity of latex agglutination test on samples obtained by transthoracic needle aspiration was evaluated for diagnosis of pneumococcal pneumonia by using the polymerase chain reaction as reference method.

METHODS: Samples from 29 patients with community acquired pneumonia were processed for culture, antigen detection and polymerase chain reaction. The latex agglutination test was performed with a reagents kit (SlideX méningite kit, BioMérieux, France) using the procedure recommended by the manufacturer.

RESULTS: Culture was positive in 5 patients, antigen detection in 15 and polymerase chain reaction in 14 patients. The specificity of latex agglutination test was 93% compared with polymerase chain reaction as reference method.

CONCLUSION: The pneumococcal antigen detection by latex agglutination test is as sensitive as the polymerase chain reaction, it seems to be highly specific, and it is rapid and easy to perform.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*.
Polymerase chain reaction. Antigen detection.

Manuscrito recibido el 29-6-1994; aceptado el 5-10-1994.

Enferm Infecc Microbiol Clin 1995; 13: 288-291.



Introducción

Las técnicas de detección de antígeno mediante anticuerpos unidos a partículas de látex han venido utilizándose en el diagnóstico microbiológico desde la segunda mitad de los años setenta¹⁻³. A pesar de la buena acogida inicial, su utilización no ha conseguido desplazar a los métodos clásicos en el diagnóstico microbiológico, debido fundamentalmente a dos causas: la dificultad de interpretación cuando se produce una reacción débil y la falta de demostración de especificidad cuando falla el aislamiento del germen. La utilización del cultivo como patrón-oro (*gold standard*) para la valoración de una técnica tiene, como es sabido, muchas limitaciones, motivadas, sobre todo, por su falta de sensibilidad en muchas circunstancias: tratamiento previo, disminución de la capacidad de adaptación del germen al nuevo sustrato, problemas relacionados con el procesamiento de la muestra, etc.

La interpretación del valor de la técnica cuando se producen discrepancias entre ésta y el resultado del cultivo se hace normalmente a favor del cultivo. En nuestra experiencia, los resultados de detección de antígeno neumocócico sobre muestras obtenidas por punción transtorácica aspirativa (PTA) son superiores a los obtenidos por cultivo, por lo que, si esta supuesta mayor sensibilidad se acompañara de un alto índice de especificidad, dispondríamos de una técnica potente, rápida y de fácil ejecución para el diagnóstico microbiológico de la neumonía neumocócica.

El objetivo de este estudio es comprobar la especificidad de los resultados obtenidos por la técnica de látex comparándola con los resultados obtenidos por técnicas de amplificación de DNA sobre la misma muestra.

Una estrecha concordancia entre la detección de antígeno y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) podría ser un argumento importante en favor de la especificidad de aquélla.

Material y métodos

Hemos procesado para este estudio las muestras obtenidas por PTA^{4,5} de 29 pacientes afectados de neumonía de adquisición extrahospitalaria. Una parte de la muestra fue sembrada en medios convencionales para aislamiento bacteriano y la parte restante fue congelada a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ a la espera de practicar posteriormente la PCR y la detección de antígeno. A todos los pacientes se les practicaron hemocultivos seriados.

En la realización de la técnica de látex para la detección de antígeno polisacárido utilizamos un kit de reactivos (Slidex méningite kit) comercializado por BioMé-

rioux (Francia), siguiendo las indicaciones del fabricante: calentamos 0,4 ml de la muestra a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un bloque térmico durante 5 minutos. Centrifugamos a 12.000 rpm en una microcentrífuga durante 10 minutos, utilizando el sobrenadante para la técnica de aglutinación.

Para la PCR utilizamos los *primers* (iniciadores) Pn2x up (CGT GGG ACT ATT TAT GAC CGA AAT GG) y Pn2x down (AAT TCC AGC ACT GAT GGA AAT AAA CAT ATT A) que amplifican el gen PBP2x de *Streptococcus pneumoniae*⁶ siguiendo el protocolo que describimos a continuación.

Extracción del DNA

Tomamos 0,5 ml de muestra y efectuamos 3-4 lavados con agua destilada a fin de provocar la lisis total de los hematíes. A continuación resuspendemos el sedimento con 300 μl de tampón de lisis (0,01 M Tris pH 7,8, 0,005 M de EDTA, 0,5% SDS) añadiendo 1,5 μl de proteinasa K e incubando una hora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Mezclamos la muestra con 400 μl de fenol-cloroformo y centrifugamos 5 minutos a 12.000 rpm para separar la fase orgánica de la fase acuosa. Colocamos ésta en un nuevo tubo de 1,5 ml y añadimos 0,6 volúmenes de alcohol isopropílico en presencia moderada de cationes monovalentes (acetato sódico y cloruro sódico a una concentración de 0,3 M y 0,2 M, respectivamente) dejando precipitar los ácidos nucleicos durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente centrifugamos el tubo durante 10 minutos, decantamos, lavamos con 1 ml de alcohol etílico al 70% y volvimos a centrifugar otros 10 minutos. Decantamos de nuevo y procedimos a la evaporación de los restos de alcohol⁹.

Resuspendimos el DNA con 100 μl de agua destilada y pasamos a realizar la fase de amplificación.

Amplificación del DNA

Preparamos una mezcla 2x con los siguientes reactivos: 10 μl de tampón de PCR (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl), 3 μl de 50 mM MgCl₂, 2 μl de 10 mM mezcla de dNTP, 1 μl de los *primers* 1 y 2 (100 pmol por reacción), 2,5 unidades de Taq polimerasa y agua destilada hasta completar 50 μl ⁹.

Para la amplificación colocamos en un tubo de 1,5 ml: 100 μl de aceite mineral, 50 μl de mezcla 2x y 50 μl de la muestra a estudiar, colocándolo en un termociclador programado de la manera siguiente: 1 ciclo de 4 minutos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$; 40 ciclos de 1,5 minutos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1,5 minutos a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 6 minutos a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$; finalizamos con un ciclo de 10 minutos a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ¹⁰.

Visualizamos el producto amplificado, un fragmento de 1,5 kb, por separación electroforética en un gel de agarosa al 3% con bromuro de etidio incorporado y observando en un transiluminador de luz ultravioleta. Realizamos la identificación de la banda comparando con la de un control positivo extraído de una suspensión sonicada de *Streptococcus pneumoniae* (fig. 1).

Para evaluar la especificidad de los *primers* utilizados en la amplificación del gen PBP2x de *Streptococcus pneumoniae*, utilizamos cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus* grupo viridans, *Haemo-*

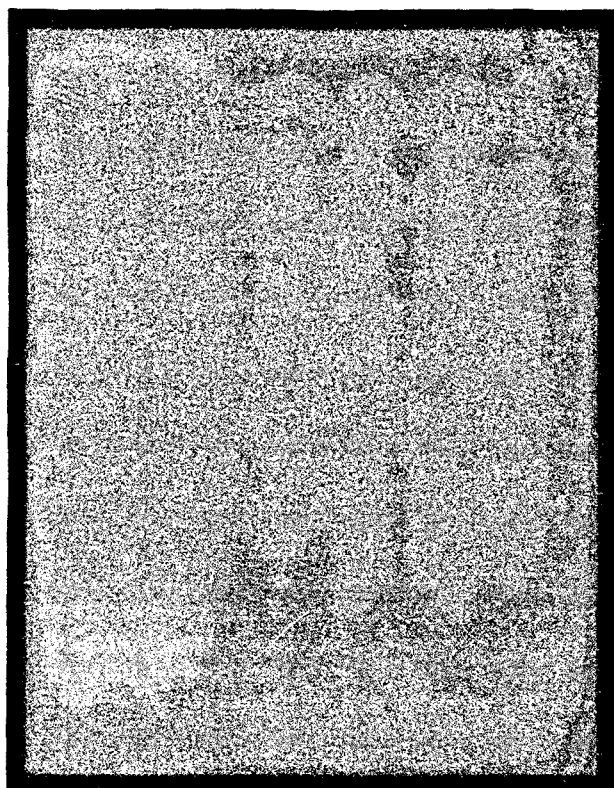


Figura 1. Visualización del amplificado en gel de agarosa al 3% con bromuro de etidio incorporado. Las bandas del amplificado corresponden a un fragmento de 1,5 kb del gen PBP2x de *Streptococcus pneumoniae*. La posición 2, donde no se aprecia ninguna banda, corresponde a la del control negativo.

philus influenzae, *Neisseria* spp., y *Legionella pneumophila*. En ninguno de estos casos obtuvimos resultados positivos por la técnica de la PCR.

Así mismo procesamos 11 muestras obtenidas por PTA de otros tantos pacientes con neumonía de las siguientes etiologías: 5 casos de neumonía por *Mycoplasma pneumoniae* (título de anticuerpos superior a 1/512 por técnicas de inmunofluorescencia); 3 casos de neumonía por *Chlamydia pneumoniae* (título de anticuerpos superior a 1/512 por inmunofluorescencia); 2 casos de neumonía vírica (título 1/160 frente a virus influenza A por técnica de reacción de fijación de complemento) y un caso de neumonía por *Coxiella burnetii* (seroconversión a las 3 semanas por reacción de fijación de complemento).

La amplificación del DNA procedente de tales muestras con los primers Pn2x up y Pn2x down de *Streptococcus pneumoniae*, así como la detección de antígeno, fueron negativas.

Posteriormente pudimos confirmar la etiología en 3 de los 5 casos de neumonía por *Mycoplasma pneumoniae* y en 2 de los 3 casos de neumonía por *Chlamydia pneumoniae* mediante técnicas de PCR utilizando primers específicos para la amplificación de DNA de estos microorganismos¹¹.

TABLA 1. Resultados obtenidos con las diferentes técnicas

Resultado	Punción transtorácica aspirativa			Hemocultivo
	Cultivo	Antígeno	PCR	
Positivo	5	15	14	7
Negativo	24	14	15	22

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

TABLA 2. Patrón de resultados por pacientes

Pacientes	Punción transtorácica aspirativa			Hemocultivo
	Antígeno	Cultivo	PCR	
2	-	-	-	+
2	+	+	+	+
3	+	-	+	+
3	+	+	+	-
6	+	-	+	-
1	+	-	-	-
12	-	-	-	-

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

Resultados

A los 29 pacientes se les practicó PTA y hemocultivo, con los siguientes resultados: el cultivo de la PTA fue positivo en 5 casos, la detección de antígeno en 15 y la PCR en 14 casos (tabla 1).

En todos los casos en que el cultivo fue positivo también lo fueron la detección de antígeno y la PCR. La detección de antígeno fue también positiva en los 14 casos en los que lo fue la PCR, siendo además positiva en un caso en el que la PCR fue negativa.

En ninguna ocasión de detección de antígeno negativa tuvimos resultados positivos ni por cultivo ni por PCR.

El hemocultivo dio resultados positivos en 7 pacientes. En 2 ocasiones el hemocultivo fue la única prueba diagnóstica. De los 5 pacientes restantes con hemocultivos positivos, dos tuvieron también la detección de antígeno, la PCR y el cultivo de la PTA positivos y en los 3 restantes la PTA fue positiva sólo para PCR y detección de antígeno (tabla 2). Trece pacientes habían recibido tratamiento previo. En estos casos el cultivo fue positivo en un paciente, la detección de antígeno en siete y la PCR en seis. El hemocultivo en pacientes con medicación previa fue positivo en 3 ocasiones.

Discusión

La detección de antígeno capsular de *Streptococcus pneumoniae* se muestra como una técnica muy sensible para el diagnóstico de la neumonía neumocócica sobre muestras obtenidas por punción trans-

torácica aspirativa, siendo esta sensibilidad tres veces superior a la del cultivo. Por lo que respecta a su especificidad sería del 93% si la referimos a los resultados de la PCR considerada como técnica de referencia. El único caso de detección de antígeno positiva no confirmada por PCR podría muy bien atribuirse a falta de sensibilidad de ésta, causada por la presencia de factores inhibidores de la polimerasa. Los múltiples lavados con agua destilada para provocar la lisis de los hematíes y los métodos para separar posteriormente el grupo hemo de la fase acuosa que contiene el DNA no siempre son efectivos, por lo que pueden darse resultados falsos negativos^{12,13}.

La correlación entre la detección de antígeno y la PCR es bastante buena por lo que creemos que los resultados positivos obtenidos por aquélla deberían interpretarse en favor de su especificidad.

Los límites de detección de la técnica están situados en 100 ng/ml de antígeno purificado. Pero la sensibilidad global en el diagnóstico de la neumonía neumocócica en este tipo de muestras depende no sólo del poder de la técnica sino también de la calidad de la muestra. En este sentido podría interpretarse la discordancia entre los 2 hemocultivos positivos y los resultados negativos obtenidos a partir de la PTA en estos mismos pacientes.

El pequeño tamaño de la muestra estudiada no nos permite opinar acerca de la rentabilidad de la PTA como procedimiento sistemático para establecer el diagnóstico de la neumonía en general, aunque creemos que si se consiguiera dirigir la punción con precisión a la zona pulmonar afectada mejoraría mucho su sensibilidad, sobre todo si completamos el cultivo con otras técnicas alternativas como la detección de antígeno y/o la PCR.

Concluimos, pues, que la detección de antígeno capsular por la técnica de látex es muy sensible, altamente específica, económica y sencilla en su ejecución.

Bibliografía

1. Coonrod JD, Rylko-Bauer B. Latex agglutination in the diagnosis of pneumococcal infection. *J Clin Microbiol* 1976; 4: 168-174.
2. Leinonen M, Herva B. The latex agglutination test for the diagnosis of meningococcal and *Haemophilus influenzae* meningitis. *Scand J Infect Dis* 1979; 9: 187-191.
3. Whittle HC, Tugwell P, Egler LS, Greenwood BM. Rapid bacteriological diagnosis of pyogenic meningitis by latex agglutination. *Lancet* 1974; 2: 619-621.
4. Zabala DC, Schoell JE. Ultrathin needle aspiration of the lung in infectious and malignant disease. *An Rev Respir Dis* 1981; 123: 125-131.
5. Wang KP, Kelly SJ, Britt JE. Percutaneous needle aspiration biopsy of chest lesions: New instrument and new technique. *Chest* 1988; 93: 993-997.
6. Manresa F, Dorca J. Needle aspiration techniques in the diagnosis of pneumonia. *Thorax* 1991; 46: 601-603.
7. Muñoz R, Coffey TJ, Daniels M, Dowson CG, Laible G, Casal J et al. Intercontinental spread of a multiresistant clone of serotype 23 F *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 1991; 164: 302-306.
8. Sambrook, Fritsch, Maniatis. *Molecular cloning*, 3ª ed. Nueva York: CSH, 1989.
9. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn RT et al. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491.
10. Dowson CG, Hutchinson A, Spratt BG. Extensive remodeling of the transpeptidase domain of penicillin-binding protein 2B of a penicillin-resistant South African isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 1989; 3 (1): 95-102.
11. Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ. *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications*. Washington: American Society of Microbiology, 1993.
12. Rudolph KM, Parkinson AJ, Black CM, Mayer LW. Evaluation of polymerase chain reaction for diagnosis of pneumococcal pneumonia. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2.661-2.666.
13. Giullespi SH, Ullman C, Smith MD, Emery V. Detection of *Streptococcus pneumoniae* in sputum samples by PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1.308-1.311.

Transthoracic Needle Aspiration in the Study of Pulmonary Infections in Patients With HIV*

Miquel Falguera, M.D.; Antoni Nogues, M.D.;
Agustin Ruiz-Gonzalez, M.D.; Mercè Garcia, M.D.; Teresa Puig, M.D.;
and Manuel Rubio-Caballero, M.D.

Study objective: To evaluate the safety and efficacy of transthoracic aspiration with an ultrathin needle in the microbiologic diagnosis of pulmonary infections in HIV-infected patients.

Design: Retrospective review of cases.

Setting: A 500-bed teaching hospital in Lleida, Spain.

Patients: Forty-five HIV-infected patients admitted between March 1989 and March 1993 with clinical and roentgenographic evidence of pulmonary infection and without contraindications for transthoracic needle aspiration (TNA).

Interventions: Forty-seven TNAs were performed in the emergency room (20) or during hospitalization (27). The TNA procedures were done without premedication and without fluoroscopic guidance. Specimens were processed using routine microbiologic and cytologic techniques; in addition, polymerase chain reaction (PCR) for *Pneumocystis carinii* was carried out since March 1992. Development of adverse effects was carefully evaluated.

Results: The TNA was effective in 29 (62 percent) out of 47 procedures. The diagnosis was obtained for 14 of 15

patients with *P carinii* pneumonia, 8 out of 14 patients with bacterial pneumonia, and 4 out of 12 patients with tuberculosis. Other pathogens recovered were *Nocardia asteroides*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodococcus equi*, and *Mycobacterium avium*. No false-positive results were obtained. Pneumothorax developed in eight (17 percent) procedures, but only one procedure resulted in a pleural drainage; the incidence of other adverse effects was low and clinically irrelevant.

Conclusion: Our study suggests that TNA can be a useful technique in establishing the etiologic diagnosis of pulmonary infections in HIV-infected patients, with a good sensitivity, high specificity, and relatively low incidence of serious complications, with TNA appearing as a reliable alternative to more uncomfortable methods. (Chest 1994; 106:697-702)

PCR=polymerase chain reaction; TNA=transthoracic needle aspiration

Pulmonary infections are very frequent in patients with AIDS. *Pneumocystis carinii*, *Mycobacterium tuberculosis*, and some pathogenic bacteria (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*) are the most common causes.¹⁻³ In addition, other pathogenic or opportunistic bacteria such as *Rhodococcus equi*⁴ or *Nocardia asteroides*,⁵ atypical mycobacteria including *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium kansasii*,⁶ and fungal or viral organisms^{2,7} have also been implicated as causes. For some of these pathogens, a clinical diagnosis could be suspected but not proven, and a dual infection is possible^{1,2}; thus, to establish the appropriate antibiotic therapy, improved methods for early etiologic diagnosis are needed.

Pneumocystis carinii has been detected in 55 to 92 percent of sputum specimens obtained from AIDS patients with *P carinii* pneumonia after careful induction.^{8,9} Microbiologic analysis of sputum is also

a good method for the diagnosis of mycobacterial infections.^{10,11} These noninvasive techniques, however, do not eliminate the need for invasive procedures in many patients. Fiberoptic bronchoscopy with bronchoalveolar lavage or transbronchial biopsy is safe and effective, and it has become the standard invasive technique,^{12,13} but it is uncomfortable for the patient, time-consuming, and expensive. In this situation, transthoracic needle aspiration (TNA) appears as a possible alternative technique since it is rapid, inexpensive, and well tolerated.

The purpose of this report was to determine the safety and efficacy of TNA in establishing the etiologic diagnosis of pulmonary infections in HIV-infected patients.

METHODS

We have reviewed the records of all HIV-infected patients with pulmonary infection undergoing TNA at Arnau de Vilanova Hospital, Lleida, Catalonia, Spain, over 4-years (March 1989 to March 1993). Patients met the following criteria: (1) at least two clinical manifestations of respiratory infection (cough, fever, purulent sputum, pleuritic chest pain, or dyspnea); and (2) presence of chest roentgenographic abnormalities (focal or diffuse infiltrate and/or cavitation). Informed consent was obtained from all subjects.

The TNA was performed as described by Manresa and Dorca,¹⁴

*From the Serveis de Medicina Interna i Microbiologia, Hospital Arnau de Vilanova, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, Lleida, Spain.

Manuscript received August 25, 1993; revision accepted January 12, 1994.

Reprint requests: Dr. Falguera, Pan Claris 21, 25008 Lleida, Spain

using a 25-gauge spinal needle (Spinocan-R), at bedside, without fluoroscopic guidance and without premedication.

In patients with acute and focal infection, TNA was usually performed simultaneously with noninvasive techniques, in the emergency room, with clinical and radiologic localization of the pneumonia. In patients with diffuse infiltration, TNA was often performed during hospitalization, on the right or left lower posterior thoracic region, when the diagnosis was not obtained by noninvasive methods (induced sputum, blood, and pleural fluid).

The spinal needle was inserted through the thoracic skin after antiseptic preparation. During suspended respiration, the needle was advanced the distance estimated necessary to reach the infiltrate (focal lesions) or it was just stopped about 2 cm before its total introduction (diffuse lesions). A 20-ml syringe containing 5 ml of normal saline solution was attached firmly to the needle and 4 ml were expelled. Thereafter, firm negative pressure was applied and maintained over 30 to 60 s while the needle was jiggled in and out several times; the 1 to 2 ml of lung sample was recuperated usually and the needle was withdrawn from the chest.

The TNA specimens were sent immediately to the laboratory for microbiologic and cytologic examination. Microbiologic evaluation included the following: Gram's and Ziehl-Neelsen stains; bacterial, mycobacterial, fungal, and occasionally viral cultures (we did not perform routinely viral cultures due to the small amount of specimen that is usually obtained); and polymerase chain reaction (PCR) for *P carinii* was carried out since March 1992. If a large amount of blood was obtained and the specimen clotted, then the clot and the remaining fluid were sent for cytologic examination using Papanicolaou and Grocott-Gomori methenamine-silver stains.

The *P carinii* amplification by PCR was performed as Wakefield et al described,¹⁵ using a set of two oligonucleotides primers that amplify the mitochondrial large rDNA sequence of *P carinii* derived from the rat, made by Durviz SL, Valencia, Spain, and provided by Unipath SA.

Prothrombin time, platelet count, arterial blood gases on room air, and chest roentgenogram were obtained in all patients before TNA procedures were performed. The technique was not applied if patients had coagulation disturbances (platelet count lower than 60,000/mm³ or prothrombin time lower than 60 percent), PaO₂ lower than 55 mm Hg, presence of bullae, untreatable cough, or previous pneumothorax.

Routinely, an expiratory chest roentgenogram was taken immediately after TNA and repeated 48 to 72 h later to rule out definitely the development of pneumothorax.

Therapy was started according to TNA results if TNA was effective. When the TNA was negative and the patient had an acute or serious infection, then treatment was started immediately based on clinical and radiologic diagnosis of suspicion. When the TNA sample was negative but the condition of the patient was not life-threatening, further bacteriologic investigations (TNA repeated, bronchoscopic techniques, or lung biopsy) were performed to establish a definitive diagnosis. All patients were followed carefully over 4 months and subsequent relevant information about new opportunistic infections was collected.

RESULTS

Forty-five HIV-infected patients with clinical and roentgenographic evidence of pulmonary infection were studied. Their ages ranged from 23 to 66 years (mean age, 32 years), and 35 (77.7 percent) were men. Intravenous drug addiction was the most frequent risk factor that was identified in 39 (86.6 percent) patients, 5 (11.1 percent) became infected through heterosexual contact, and 1 (2.2 percent) was

Table 1—Pulmonary Infections Seen in 45 Patients

Pulmonary Infection	Patient No.
<i>P carinii</i> pneumonia	15*
Bacterial pneumonia	14
Tuberculosis	12*
Nocardiosis	1
<i>M avium</i> infection	1
Cryptococcosis	1
Varicella pneumonia	1
Cytomegalovirus pneumonia	1
<i>R equi</i> lung abscess	1

*Two patients had dual infection: *P carinii* pneumonia and tuberculosis.

a homosexual man. Sixteen (35.5 percent) patients had a previous diagnosis of AIDS manifested by the following: extrapulmonary tuberculosis, 10 patients; *P carinii* pneumonia, 4 patients; toxoplasmic encephalitis, 2 patients; and *Candida* esophagitis, 1 patient. One patient previously had two opportunistic infections. Table 1 summarizes the pulmonary infections seen in these 45 patients.

Pulmonary aspiration was done once on 43 patients and on two patients the aspiration was repeated; thus, 47 TNAs were done. Twenty TNA procedures were performed in the emergency room and during hospitalization; the other 27 procedures were performed between 2 to 40 days of admission (mean, 7.4 days).

Microorganisms were isolated in 29 (61.7 percent) out of 47 TNA samples. Lung aspirates yielded a single isolation in 27 patients while two organisms were recovered from two lung aspirates.

The *P carinii* was the most frequent pulmonary pathogen identified. It was recovered from 14 (93.3

Table 2—Results of Diagnostic Studies in 15 Patients With *P carinii* Pneumonia*

Patient No.	TNA		Induced Sputum		Other Diagnostic Procedures
	MS stain	PCR	MS stain	PCR	
1	(+)	ND	(-)	ND	
2	(+)	ND	(-)	ND	
3	(+)	ND	(-)	ND	
4	(+)	ND	(-)	ND	BAI; MS stain (-)
5†	(-)	ND	(-)	ND	
6	(-)	(+)	(-)	(-)	
7	(+)	(+)	(-)	(-)	
8	(-)	(+)	(-)	(-)	
9	(+)	(-)	(+)	(+)	
10	(-)	(+)	(-)	(-)	
11†	(-)	(+)	(-)	(-)	
12	(+)	(+)	(-)	(+)	
13†	(+)	ND	ND	(-)	
14	(+)	(+)	(+)	(+)	
15	(-)	(+)	(-)	(-)	

*TNA=transthoracic needle aspiration; BAI=bronchoalveolar lavage; MS=methenamine-silver; PCR=polymerase chain reaction; ND=not done.

†Patient without microbiologic confirmation.

‡Patient with tuberculosis, simultaneously.

Table 3—Results of Diagnostic Studies in 14 Patients With Bacterial Pneumonia

Patient No.	TNA	Sputum	Blood	Other Diagnostic Procedures
1	(-)	(-)	<i>S pneumoniae</i>	
2	(-)	<i>S pneumoniae</i>	(-)	
3*	(-)	(-)	(-)	
4	<i>S aureus</i>	(-)	<i>S aureus</i>	Pleural fluid: <i>S aureus</i>
5	<i>S aureus</i>	(-)	(-)	
6	<i>S pneumoniae</i> <i>H influenzae</i>	(-)	(-)	
7	<i>S pneumoniae</i>	(-)	(-)	
8	<i>S pneumoniae</i>	ND	(-)	
9	<i>S pneumoniae</i>	ND	(-)	Pleural fluid: <i>S pneumoniae</i>
10	<i>S pneumoniae</i>	ND	(-)	
11	(-)	(-)	<i>S pneumoniae</i>	
12	(-)	<i>S pneumoniae</i>	(-)	
13	(-)	<i>S pneumoniae</i>	(-)	
14	<i>H influenzae</i>	(-)	(-)	

*Patient without microbiologic confirmation; TNA=transthoracic needle aspiration; ND=not done.

percent) out of 15 patients with a definitive diagnosis of *P carinii* pneumonia. Results of diagnostic studies are shown in Table 2. All TNA specimens were stained by Grocott-Gomori methenamine-silver method, and organisms were found in nine (60 percent) patients; also, nine specimens were studied by PCR that identified *P carinii* in eight (88.9 percent) patients. The patient with a negative TNA had only a presumptive clinical diagnosis and recovered with trimethoprim-sulfamethoxazole treatment.

The etiologic diagnosis was also obtained by TNA in 8 (57.1 percent) out of 14 patients (Table 3) who had bacterial pneumonia, 4 of whom were receiving effective antibiotic treatment. *Streptococcus pneumoniae* was the most frequent bacterial agent, isolated in lung aspiration of five patients; and *Staphylococcus aureus* and *H influenzae* were each identified in two patients (*S pneumoniae* and *H influenzae* were simultaneously recovered from one patient). Among the six patients with a negative TNA, *S pneumoniae* was identified as the causal

agent in five cases (blood culture two, sputum culture three), and the cause remained unknown in the other patient.

Twelve patients had tuberculosis but the TNA specimen resulted in diagnosing only four patients (33.3 percent). As Table 4 shows, Ziehl-Neelsen stain of TNA was positive for only one (8.3 percent) patient and mycobacterial culture of lung aspirate was positive in four patients. Among the eight patients with a negative TNA result, the diagnosis of tuberculosis was established microbiologically in five through the following samples: culture of sputum, three patients; culture of urine, one patient; and bone marrow biopsy and culture, one patient. Diagnosis in the remaining three patients was based upon clinical presumption and therapeutic response.

Other organisms were recovered by TNA in four patients: *N asteroides*, one patient; *M avium*, one patient; *R equi*, one patient; and *C neoformans*, one patient (Table 5). Two pathogens, *R equi* and *C neoformans*, were obtained in a second TNA sample,

Table 4—Results of Diagnostic Studies in 12 Patients With Tuberculosis*

Patient No.	TNA		Sputum		Other Diagnostic Procedures
	ZN Stain	Culture	ZN Stain	Culture	
1	(-)	(-)	(-)	(-)	Bone marrow (+) urine/blood/stool (-)
2	(-)	(-)	(-)	(-)	Urine (+) blood/stool (-)
3†	(-)	(-)	(-)	(-)	
4†	(-)	(-)	(-)	(-)	CSF/blood/urine (-)
5†	(-)	(-)	(-)	(-)	CSF/blood/urine (-) blood (-)
7‡	(-)	(-)	(+)	(+)	
8	(-)	(-)	(-)	(+)	BAL./blood (-)
9	(-)	(-)	(-)	(+)	
10	(-)	(+)	(-)	(+)	Blood (-)
11	(-)	(+)	(-)	(+)	Blood (-)
12‡	(-)	(+)	(+)	(+)	

*TNA=transthoracic needle aspiration; BAL=bronchoalveolar lavage; CSF=cerebrospinal fluid; ZN=Ziehl-Neelsen; ND=not done.

†Patient without microbiologic confirmation.

‡Patient with *P carinii* pneumonia, simultaneously.

Table 5—Results of Diagnostic Studies in 6 Patients With Other Pulmonary Infections

Patient No.	Pulmonary Infection	TNA	Other Diagnostic Procedures
1	<i>R equi</i> lung abscess	1st (-) 2nd (+)	BAL. (+) sputum/blood (-)
2	Cryptococcosis	1st (-) 2nd (+)	CSF:ND sputum/blood/ urine (-)
3	Cytomegalovirus pneumonia	(-)	lung biopsy (+) BAL (-)
4*	Varicella pneumonia	(-)	
5	Nocardiosis	(+)	Sputum/blood (-)
6	<i>M avium</i> infection	(+)	sputum/blood (-)

*Patient without microbiologic confirmation; TNA=transthoracic needle aspiration; BAL=bronchoalveolar lavage; CSF=cerebrospinal fluid; ND=not done.

after a first negative result. Viral culture of TNA was not useful in the diagnosis of varicella pneumonia (one patient), which was only established clinically, and in cytomegalovirus pneumonia (one patient), shown by a lung biopsy.

The overall sensitivity of the TNA procedure was 61.7 percent, and helped diagnose 64.4 percent (29/45) of the patients, although TNA obtained only one of the two pathogens in one patient with a dual infection. When TNA results were negative (18 patients), the etiologic diagnosis was microbiologically shown in 12 by means of sputum culture (6 patients), blood culture (2 patients), urine culture (1 patient), bone marrow biopsy and culture (1 patient), and a second TNA (2 patients). Bronchoscopic procedures were performed in addition to TNA for four patients, but bronchoscopic specimens did not show more pathogens. The absence of isolation of false-positive pathogens carried a specificity of 100 percent.

Five (11.1 percent) patients died directly from or related to the pulmonary infectious illness, and seven (15.5 percent) died during the follow-up because of nonpulmonary infections. Surviving patients treated according to microbiologic or clinical diagnosis were followed up for 4 months. One patient subsequently developed tuberculosis and *P carinii* pneumonia 14 and 16 weeks later, respectively. One additional patient had tuberculosis 4 weeks later. Three patients were unable to be contacted for follow-up, and the remaining patients were still alive at the end of the follow-up period.

Pneumothorax was the major and more frequent complication, occurring in eight (17.0 percent) procedures. Chest roentgenograms taken 3 days after TNA showed pneumothorax not seen immediately in one patient. In our study, no patients were receiving aerosol pentamidine, but no relationship was found between the development of pneumothorax and the underlying process; thus, among patients with *P*

carinii pneumonia, the incidence of pneumothorax was 13.3 percent (2 of 15 patients). Pneumothorax was minimal in patients, but in two patients exceeded 15 percent, and one patient was symptomatic and required a pleural drainage. The chest tube helped the procedure. None of those patients who developed pneumothorax had recurrences during the follow-up.

In addition, two patients (4.3 percent) developed mild hemoptysis, which stopped spontaneously, and three (6.4 percent) patients required analgesia after the procedure. No serious vagal reactions were seen, and no relationship between TNA complications and death was found.

DISCUSSION

The direct needle aspiration of a pulmonary lesion through the chest wall is an old technique used since the last decades of 19th century.¹⁶ Thereafter, numerous reports have appeared describing its application in the cytologic examination of lung nodules.^{17,18} The use of TNA in the study of pulmonary infections was developed poorly, but it was evaluated by Zavala and Schoell in 1981,¹⁹ and more recently by Manresa and Dorca,¹⁴ who reviewed in detail its methodology, efficacy, and safety. Ultrathin needles have been associated with a decreased complication rate while maintaining a good sensitivity.¹⁹ The diagnostic yield obtained has varied from 40 to 90 percent, depending on the type of infection and the presence or absence of previous antibiotic treatment. The specificity has been almost 100 percent, and the incidence of pneumothorax ranged usually from 3 to 20 percent.^{14,19-22} In addition, patients' acceptance is good, the application is simple, and the method is rapid and inexpensive.

In our study, TNA procedures using an ultrathin needle performed on HIV-infected patients with pulmonary infection showed a sensitivity of 61.7 percent. Many of these patients had previous noninvasive diagnostic studies with negative results, and some of them were receiving appropriate antibiotic therapy. Furthermore, no false-positive results were observed; thus, the specificity was 100 percent.

The value of TNA in the diagnosis of *P carinii* pneumonia has been excellent, effective in 14 out of 15 patients. Chaudhary et al²³ had already reported in 1977 the usefulness of lung aspirates for detecting *P carinii* among children and adolescent cancer patients; however, in HIV-infected patients, whose *P carinii* is the most common cause of pneumonia, the diagnostic value of TNA has not been completely assessed.²⁴ The PCR technique has recently been used for diagnosis of *P carinii* infection. Wakefield et al²⁵ detected specific DNA sequences of *P carinii* in 90 and 95 percent of induced sputum and bronchoalveolar lavage samples respectively.²⁵ Our findings

showed the efficacy of the method applied to lung aspirates. Among nine patients with *P carinii* pneumonia, PCR was positive in all but one. Our results with the PCR method for *P carinii* have already been described in a previous report.²⁶

The TNA showed a good sensitivity in the diagnosis of pathogenic bacterial pneumonias. Our results did not differ from those reported by others; the sensitivity obtained in these studies, in patients without HIV-infection, ranged between 60 and 90 percent¹⁹⁻²⁰ (40 percent in patients with prior antibiotic therapy).²¹ In this situation, noninvasive investigations contribute poorly to precise etiologic diagnosis, and the treatment often is established empirically.²⁷ *Streptococcus pneumoniae* was the most common cause isolated, but, as several reports have described, other pathogenic bacteria must also be considered.^{28,29}

Although tuberculosis is the most frequent AIDS-qualifying diagnosis at our institution,³⁰ detection of *Mycobacterium tuberculosis* by TNA was infrequent. The possible reasons are multiple. First, Ziehl-Neelsen stains of sputum are generally positive and invasive techniques are needed infrequently;^{10,11} thus, in our study, TNA was performed probably only in those patients with a smaller population of mycobacteria. Second, the frequencies of positive acid-fast smears obtained by bronchoscopic specimens from HIV-infected patients have also been reported lower than in non-HIV-infected patients.¹¹ Finally, roentgenographic pictures of tuberculosis in HIV-infected patients are generally those of primary tuberculosis (hilar adenopathy, miliary pattern), in which Ziehl-Neelsen stains of pulmonary samples are rarely positive.³¹ The use of PCR for identification of mycobacteria in TNA specimens could also increase its diagnostic value.³²

Other pathogenic microorganisms such as *N asteroides*, *R equi*, atypical mycobacteria, and *C neoformans*, which are more infrequent causes of pneumonia in HIV-infected patients,^{1,4,5,33} could also be recovered by means of TNA; whereas, no patients had microbiologic or cytologic evidence of viral pneumonia.

The real incidence of cytomegalovirus pneumonia in HIV-infected patients is not yet well established even though the presence of characteristic viral inclusion bodies or the detection of cytomegalovirus in cultures of bronchoscopic specimens is frequent;^{1,2} certainly, its clinical or prognostic significance is not clear,^{34,35} but we did not find any evidence of this infection. Thus, we cannot recommend the use of lung aspiration in patients with suspicion of viral pneumonia, and further evaluation of its diagnostic value is needed.

Before the AIDS epidemic, pneumothorax was al-

ready described in patients with *P carinii* pneumonia.³⁶ The risk of pneumothorax is increased among AIDS-patients with a history of aerosol pentamidine use or with previous or concurrent episodes of *P carinii* pneumonia, affecting between 2 and 6 percent of them.^{37,38} Furthermore, emphysema-like bullous changes of the lung have been identified in patients with prolonged HIV-infection.³⁹ According to these factors, a careful evaluation of the rate of adverse effects, particularly pneumothorax, was mandatory in our study.

Chaudhary et al²³ reported, among cancer-patients with *P carinii* pneumonia, a very high risk of pneumothorax after lung aspirates, developed in 43 percent of cases.²³ Although the chance of pneumothorax can be decreased by the smaller size of the needles used in our study, we found pneumothorax in over 17 percent of the procedures performed. In our experience, lung aspirates performed in non-HIV-infected patients with pneumonia (more than 200 procedures over a 5-year period) carry a rate of pneumothorax lower than 5 percent (unpublished data). No patients were receiving aerosol pentamidine; however, patients with *P carinii* infection had no major risk of developing pneumothorax than those with other pulmonary pathogens.

Despite the altered autonomic nervous system functions shown in HIV-infected patients,^{40,41} no severe vagal reactions were observed in our study. The incidence of hemoptysis was low and clinically irrelevant and no patients died in relation to TNA.

In comparison to bronchoscopic techniques, even with transbronchial biopsy, the risk of developing pneumothorax appears to increase with the use of TNA; however, fever, pneumonia, and bronchospasm, the most common complications of fiberoptic bronchoscopy,^{13,42} were not found after TNA.

In summary, this study suggests that TNA with an ultrathin needle can be useful for the diagnosis of pulmonary infections in HIV-infected patients; furthermore, its efficacy can be increased significantly with the use of PCR methods. When the etiologic diagnosis cannot be determined through noninvasive techniques, TNA appears as an alternative to bronchoscopic techniques because its application is more simple, rapid, inexpensive, and well tolerated. Finally, despite the occurrence of pneumothorax in 17 percent of our patients, pleural drainage was usually unnecessary and the overall incidence of clinically relevant adverse effects was relatively low.

REFERENCES

- 1 Stover DE, White DA, Romano PA, Gellene RA, Robeson WA. Spectrum of pulmonary diseases associated with the acquired immune deficiency syndrome. *Am J Med* 1985; 78:429-37
- 2 Hopewell PC, Luce JM. Pulmonary involvement in the ac-

- quired immunodeficiency syndrome. *Chest* 1985; 87:104-12
- 3 Chaisson RE, Slutkin G. Tuberculosis and immunodeficiency syndrome. *J Infect Dis* 1989; 159:96-100
 - 4 Sane DC, Durack DT. Infection with *Rhodococcus equi* in AIDS. *N Engl J Med* 1986; 314:56-7
 - 5 Javaly K, Horowitz HW, Wormser GP. Nocardiosis in patients with human immunodeficiency virus infection: report of 2 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 1992; 71:128-38
 - 6 Sherer R, Sable R, Sonnenberg M, Cooper S, Spencer P, Schwimmer S, et al. Disseminated infection with *Mycobacterium kansasii* in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 1986; 105:710-12
 - 7 Denning DW, Follansbee SE, Scolaro M, Norris S, Edelstein H, Stevens DA. Pulmonary aspergillosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1991; 324:654-62
 - 8 Zaman MK, Wooten OJ, Suprahmanya B, Ankobiah W, Finch PJP, Kamholz SL. Rapid noninvasive diagnosis of *Pneumocystis carinii* from induced liquefied sputum. *Ann Intern Med* 1988; 109:7-10
 - 9 Kovacs JA, Ng VL, Masur H, Leoung G, Hadley WK, Evans G, et al. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia: improved detection in sputum with use of monoclonal antibodies. *N Engl J Med* 1988; 318:589-93
 - 10 Kramer F, Modilevsky T, Waliqny AR, Laxdom JM, Barnes PF. Delayed diagnosis of tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *Am J Med* 1990; 89:451-56
 - 11 Barnes PF, Bloch AB, Davidson PT, Snider DE. Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1991; 324:1644-50
 - 12 Stover DE, White DA, Romano PA, Gellene RA. Diagnosis of pulmonary disease in acquired immune deficiency syndrome (AIDS): role of bronchoscopy and bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130:659-62
 - 13 Broaddus C, Dake MD, Stulberg MS, Blumenfeld W, Hadley WK, Golden JA, et al. Bronchoalveolar lavage and transbronchial biopsy for the diagnosis of pulmonary infections in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 1985; 102:747-52
 - 14 Manresa F, Dorca J. Needle aspiration techniques in the diagnosis of pneumonia. *Thorax* 1991; 46:601-03
 - 15 Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S, Sinclair K, Miller RF, Moxon ER, et al. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet* 1990; 336:451-53
 - 16 Leyden H. Ueber infectiose pneumoniae. *Deutsche Med Wschr* 1883; 9:52-4
 - 17 Penketh ARL, Robinson AA, Barker V, Flower CDR. Use of percutaneous needle biopsy in the investigation of solitary pulmonary nodules. *Thorax* 1987; 42:967-71
 - 18 Wang KP, Kelly SJ, Britt JE. Percutaneous needle aspiration biopsy of chest lesions: new instrument and new technique. *Chest* 1988; 93:993-97
 - 19 Zavala DC, Schoell JE. Ultrathin needle aspiration of the lung in infectious and malignant disease. *Am Rev Respir Dis* 1981; 123:125-31
 - 20 Dorca J, Boada J, Verdager R, Ariza J, Fernández-Viladrich P, Estopà R, et al. The transthoracic aspiration with ultrathin needle in the diagnosis of bacterial pulmonary infection [abstract]. *Eur Respir J* 1988; 1(suppl 2):264S
 - 21 Torres A, Jiménez P, Puig de la Bellacasa J, Celis R, González J, Gea J. Diagnostic value of nonfluoroscopic percutaneous lung needle aspiration in patients with pneumonia. *Chest* 1990; 98:840-44
 - 22 Peña Griñan N, Muñoz Lucena F, Vargas Romero J, Alfageme Michavila I, Umbria Dominguez S, Florez Alia C. Yield of percutaneous needle lung aspiration in lung abscess. *Chest* 1990; 97:69-74
 - 23 Chaudhary S, Hughes WT, Feldman S, Sanyal SK, Coburn T, Ossi M, et al. Percutaneous transthoracic needle aspiration of the lung diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Am J Dis Child* 1977; 131:902-07
 - 24 Masur H, Lane HC, Kovacs JA, Allegra CJ, Edman JC. *Pneumocystis* pneumonia: from bench to clinic. *Ann Intern Med* 1989; 111:813-26
 - 25 Wakefield AE, Guiver L, Miller RF, Hopkin JM. DNA amplification on induced sputum samples for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet* 1991; 337:1378-79
 - 26 Nogués A, García M, Rivas C, Falguera M, Puig T, Ruiz A. Detection of *Pneumocystis carinii* in clinical specimens by polymerase chain reaction: comparison with methenamine silver stain. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1993; 11:143-46
 - 27 Woodhead MA, Arrowsmith J, Chamberlain-Welbber R, Wooding S, Williams I. The value of routine microbial investigation in community-acquired pneumonia. *Respir Med* 1991; 85:313-17
 - 28 Schlamm HT, Yancovitz SR. *Haemophilus influenzae* pneumonia in young adults with AIDS, ARC, or risk of AIDS. *Am J Med* 1989; 86:11-4
 - 29 Witt DJ, Craven DE, McCabe WR. Bacterial infections in adult patients with the acquired immune deficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *Am J Med* 1987; 82:900-06
 - 30 Falguera M, Ruiz A, Pérez J, Puig T. Extrapulmonary tuberculosis and tuberculin skin test: Is it a useful diagnostic proof? Third European conference on clinical aspects and treatment of HIV infection [abstract] Paris; 1992: 148
 - 31 Long RL, Maycher B, Scalcini M, Manfreda J. The chest roentgenogram in pulmonary tuberculosis patients seropositive for human immunodeficiency virus type 1. *Chest* 1991; 99:123-27
 - 32 Brisson-Noel A, Aznar C, Chureau C, Nguyen S, Pierre C, Bartoli M, et al. Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. *Lancet* 1991; 338:364-66
 - 33 Chechani V, Kamholz SL. Pulmonary manifestations of disseminated cryptococcosis in patients with AIDS. *Chest* 1990; 98:1060-66
 - 34 Jacobson MA, Mills J. Serious cytomegalovirus disease in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): clinical findings, diagnosis, and treatment. *Ann Intern Med* 1988; 108:585-94
 - 35 Jacobson MA, Mills J, Rush J, Peiperl L, Seru V, Mohanty PK, et al. Morbidity and mortality of patients with AIDS and first-episode *Pneumocystis carinii* pneumonia unaffected by concomitant pulmonary cytomegalovirus infection. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144:6-9
 - 36 Walzer PD, Perl DP, Krogstad DJ, Rawson PG, Schultz MG. *Pneumocystis carinii* pneumonia in the United States: epidemiologic, diagnostic, and clinical features. *Ann Intern Med* 1974; 80:83-93
 - 37 Sepkowitz KA, Telzak EE, Gold JWM, Bernard EM, Blum S, Carrow M, et al. Pneumothorax in AIDS. *Ann Intern Med* 1991; 114:455-59
 - 38 Shanley DJ, Luycks BA, Haggerty MF, Murphy TF. Spontaneous pneumothorax in AIDS patients with recurrent *Pneumocystis carinii* pneumonia despite aerosolized pentamidine prophylaxis. *Chest* 1991; 99:502-04
 - 39 Diaz PT, Clanton TL, Pacht ER. Emphysema-like pulmonary disease associated with human immunodeficiency virus infection. *Ann Intern Med* 1992; 116:124-28
 - 40 Cohen JA, Laudenslager M. Autonomic nervous system involvement in patients with human immunodeficiency virus infection. *Neurology* 1989; 39:1111-12
 - 41 Villa A, Foresti V, Confalonieri F. Autonomic nervous system dysfunction associated with HIV infection in intravenous heroin users. *AIDS* 1992; 6:85-9
 - 42 Fulkerson WJ. Fiberoptic bronchoscopy. *N Engl J Med* 1984; 311:511-15

by Polymerase Chain Reaction in Lung Aspirates From Patients With Community-Acquired Pneumonia*

Miquel Falguera, MD; Antoni Nogues, MD; Agustín Ruiz-González, MD; Mercé García, MD; and Teresa Puig, MD

Study objective: This study was designed to evaluate the usefulness of polymerase chain reaction (PCR) to detect *Mycoplasma pneumoniae* DNA in samples obtained by transthoracic needle aspiration (TNA).

Design: Prospective study of cases.

Setting: A university hospital in Lleida, Spain.

Patients: A total of 101 unselected patients, admitted between January 1993 and March 1994 in the emergency department, with a clinical and radiologic picture of community-acquired pneumonia, and without contraindications for TNA application.

Interventions: Patients were studied with conventional diagnostic techniques for community-acquired pneumonia. In addition, a sample obtained by TNA was processed by the following methods: culture in standard media, culture in selective media for *Legionella*, detection of capsular antigens for *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*, and detection of *M pneumoniae* specific genome by PCR.

Results: Serologic data were not available in eight patients and were excluded from this analysis. *M pneumoniae* PCR amplification was possible in eight cases, well correlated with serologic responses indicating current infection. Samples from ten additional patients, negative by PCR, were found to be demonstrative of recent *M pneumoniae* infection by serologic study. Finally, in all the remaining 75 cases, including the 59 patients for whom a different microbial diagnosis was established, *M pneumoniae* PCR test gave negative results.

Conclusion: This study indicates that PCR, applied to samples obtained by TNA, appears to be a moderately sensitive and highly specific method for rapid detection of *M pneumoniae* lung infection. (CHEST 1996; 110:972-76)

Key words: community-acquired pneumonia; *Mycoplasma pneumoniae*; polymerase chain reaction; transthoracic needle aspiration

Abbreviations: PCR=polymerase chain reaction; TNA=transthoracic needle aspiration

M*ycoplasma pneumoniae* is a frequent pathogen causing community-acquired pneumonia.¹⁻³ Laboratory evidence of this infection has been found in 5 to 30% of pneumonias in the general population, and up to 50% of cases that appear in epidemic periods. Certainly, most of them are relatively mild,⁴ but more severe and even fatal cases can also occur.^{5,6} In addition, mycoplasmal infections are readily treatable. Therefore, the development of rapid, sensitive, and specific microbiologic diagnostic techniques is necessary.

Isolation of the organism by culture and detection serologic procedures are currently available methods but both have some limitations.² Thus, although cultures, in experienced hands, are sensitive tests, isolation of *M pneumoniae* is difficult, available in only a few laboratories, and too slow to be clinically relevant. However, the diagnosis made by serologic study is only retrospectively available, requiring paired serum samples to demonstrate a significant increase in antibody titer; in addition, false-negative results among immunocompromised hosts have been found frequently.

Recently, polymerase chain reaction (PCR) tests for the detection of *M pneumoniae* have been developed.¹⁰⁻¹² These techniques seem to be useful for rapid diagnosis and they have high sensitivity and specificity. However, if they are to be used on a routine basis, these promising results need validation.

*From the Service of Internal Medicine (Drs. Falguera, Ruiz-González, and Puig) and the Service of Microbiology (Drs. Nogues and García), Hospital Arnau de Vilanova, Lleida, Spain. Manuscript received October 3, 1995; revision accepted May 6, 1996.

Reprint requests: Dr. Falguera, Pau Claris 21, 25008 Lleida, Spain

such data has been published to date.

The purpose of this study was to evaluate, in comparative study with serologic data, the usefulness of PCR for detecting *M pneumoniae* infection applied to samples obtained directly from lung parenchyma of patients with community-acquired pneumonia.

MATERIALS AND METHODS

This study was performed at Arnau de Vilanova Hospital, a 500-bed teaching hospital in Lleida, Catalonia (Spain) that serves a predominantly rural population of approximately 400,000. Over a 15-month period (January 1993 to March 1994), all adult patients admitted to the emergency service with a clinical and radiologic diagnosis of primary community-acquired pneumonia were studied prospectively.

Microbiological Techniques

The following microbiological tests were used routinely. (1) Two blood specimens were obtained before treatment and cultured, aerobically and anaerobically, in standard methods. (2) When it was possible, a fresh spontaneous or induced sputum specimen was collected and cultured in standard and selective media for *Legionella* species. (3) In patients with pleural effusion, a sample of pleural fluid was obtained by thoracentesis and cultured in standard methods. (4) Serum samples were collected on days 1 and 30. Both were simultaneously assayed for antibody detection to influenza virus (complement fixation test), *Chlamydia pneumoniae* (microimmunofluorescence test), *Chlamydia psittaci* (complement fixation test), *Coxiella burnetii* (complement fixation test), *Legionella pneumophila* (immunofluorescence test), and *M pneumoniae* (immunofluorescence test). (5) When no contraindications (coagulation disturbances, PaO₂ <55 mm Hg, presence of bullae, or untreatable cough) were appreciated, transthoracic needle aspiration (TNA) by using an ultrathin needle (25G) was performed as described by Manresa and Dorca.¹³ Briefly, during suspended respiration, the spinal needle was inserted through the thoracic skin and advanced the distance estimated necessary to reach the infiltrate. A 20-mL syringe containing 10 mL of normal saline solution was attached firmly to the needle and 8 mL was expelled. Thereafter, firm negative pressure was applied and maintained over 30 to 60 s while the needle was jiggled in and out several times; the 2.5- to 3-mL of sample recovered was sent immediately to the laboratory and processed by the following methods: culture in standard bacterial media, aerobically and anaerobically (0.5 mL); culture in selective media for *Legionella* (0.5 mL); detection of capsular antigens of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by latex agglutination (0.5 mL); and detection of *M pneumoniae*-specific genome by PCR (0.5 mL). In some cases, a fraction of sample (0.5 mL) was also processed for detection of *Mycobacterium tuberculosis* or opportunistic agents. Prior informed consent was obtained from each patient.

Diagnosis of *M pneumoniae* Infection

The diagnosis of *M pneumoniae* infection was based on the following test results. (1) Serology: determination of *M pneumoniae*-specific antibody was performed by using a commercial IgG immunofluorescent assay (Boehringer Ingelheim), according to the manufacturer's recommendations. When it was available, paired serum specimens were simultaneously tested. Antibody titers of 1:64 or less were recorded as negative while a fourfold or greater rise in titers or standing titers of 1:128 or greater were regarded as evidence of present *M pneumoniae* infection. (2) PCR: a total of 0.5

centrifuged and the pellet was resuspended in 300 μ L of lysis buffer (0.01 mol/L Tris HCl [pH, 7.8], 0.005 mol/L EDTA) and incubated for 1 h at 37°C with 0.5% sodium dodecyl sulfate and 1.5 μ L of proteinase K. Then, the sample was mixed with 400 μ L of phenol-chloroform and centrifuged at 12,000 rpm for 5 min to separate organic and aqueous phases. This was placed in a 1.5-mL new tube and 0.6 volumes of isopropyl alcohol was added. The nucleic acid was precipitated by the addition of 0.3 mol/L sodium acetate and 0.2 mol/L sodium chloride and incubation for 10 min at room temperature.

Further, the tube was centrifuged for 10 min, and the sample was decanted and washed with 70% ethanol; it was newly centrifuged for 10 min and the supernatant was removed. Finally, DNA was resuspended in 100 μ L of distilled water.

For DNA amplification, we used the primer set MP5-1 (GAAGCTTATCGGTACAGGTTGG) and MP5-2 (ATTACCATCCTTGTTGTAAGG) (purchased from Cruachem Ltd; Glasgow, UK), described by Bemet et al,¹⁰ which resulted in an amplification product of 144 base-pairs. The reaction mixture was prepared following the indications previously described.¹⁴ The amplification was performed in a thermocycler (model IHB2024; Cherlyn Electronics Ltd; Cambridge, UK), heating the sample at 94°C for 4 min for a cycle, and then 40 cycles of amplification were performed as follows: 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, and 72°C for 1 min. An additional incubation at 72°C for 10 min was added at the end to complete the elongation.

The amplified product was analyzed by 3% agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining, and examined by UV transillumination. Identification of the size of the band was performed by comparison with standard molecular weights (100 base pairs [bp] DNA ladder; GIBCO BRL).

To prevent contamination, a strict spatial separation of the different technical steps involved in PCR was maintained during the process, and the recommendations of Kwok and Higuchi¹⁵ were followed. In addition, positive and negative control was added in each assay for avoiding false PCR results.

Diagnosis of the Remaining Etiologies

For the other pathogens, the etiologic diagnosis was made by using one or more of the following criteria: (1) organisms isolated by culture of blood, TNA, or pleural fluid; (2) isolation of *Legionella* species in selective media from sputum or TNA samples; (3) detection of capsular antigens of *S pneumoniae* or *H influenzae* in TNA samples; and (4) a fourfold or greater rise in antibody titers or, alternatively, stable titers of 128 or greater for immunofluorescence serologic tests, 256 or greater for microimmunofluorescence serologic test, or 20 or greater for complement fixation serologic tests.

RESULTS

One hundred twenty-six consecutive patients with community-acquired pneumonia were enrolled in the study; 18 of them were immunocompromised. Twenty-five patients were subsequently considered not evaluable in this study for the following reasons: 3 did not accept the study, 10 had contraindications for TNA (PaO₂ <55 mm Hg, 5; coagulation disturbances, 3; and untreatable cough, 2), and 12 had a final diagnosis of infection by *M tuberculosis* (2 cases) or opportunistic microorganisms (*Pneumocystis carinii*, 8; cytomegalovirus, 1; and *Cryptococcus neoformans*, 1). In addi-

Microorganisms	No. of Patients*
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	28
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	18
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	9
Influenza virus	6
<i>Chlamydia species</i>	6
<i>Haemophilus influenzae</i>	5
<i>Chlamydia psittaci</i>	4
<i>Coxiella burnetii</i>	2
<i>Streptococcus viridans</i>	1
<i>Enterococcus faecium</i>	1
Etiology unknown	16

*Included three patients with dual diagnoses: *S pneumoniae*-*C pneumoniae* (2); and *S viridans*-*C pneumoniae* (1).

tion, serologic samples were missing in 8 patients; thus, 93 patients were finally eligible for analysis.

We were able to make a diagnosis, according to the criteria described above, in 77 (83%) cases. Frequently, etiologic diagnosis was based on simultaneous positivity of more than one diagnostic test. For a few patients, tests were positive for two different pathogens. Specific etiologies are shown in Table 1. Adverse effects of TNA were infrequently observed: two developed a minimal pneumothorax and treatment was not necessary; seven experienced mild hemoptysis; and three required analgesia after the procedure.

For serologic data, *M pneumoniae* was considered responsible for 18 episodes of pneumonia, and no cases of mixed infection with other pulmonary pathogens were observed. No significant epidemic pattern was found during the study. Most of these patients were young adults (11 were younger than 45 years), without underlying disease (no patients were immunocompromised), having a prodromal illness and a clinical picture characterized by fever and nonproductive cough, and frequently showed signs of pulmonary consolidation

Table 2—Clinical and Laboratory Features of 18 Patients With *M pneumoniae* Infection

Data	Values
Age, yr, mean±SD	41±18
Underlying disease, No. of patients (%)	7 (39)
Duration of symptoms before hospital admission, d, mean±SD	5±3
Temperature ≥38°C, No. (%)	18 (100)
Chills, No. (%)	3 (17)
Cough, No. (%)	17 (94)
Expectoration of purulent material, No. (%)	5 (28)
Pleuritic chest pain, No. (%)	8 (44)
Signs of consolidation, No. (%)	12 (67)
Leukocyte count ≥15,000/mm ³ , No. (%)	4 (22)
Increased percentage of immature granulocytes ≥5%, No. (%)	2 (11)
Pt ₁₂ ≤60 mm Hg, No. (%)	3 (17)

PCR Data	Serologic Data	
	Positive*	Negative
Positive	8	0
Negative	10	75

*A fourfold or greater rise or standing ≥1:128 titers were considered as positive.

†Titers ≤1:64 were considered as negative.

(Table 2). Chills, chest pain, and dyspnea, as well as leukocytosis, were unusual findings. Radiologically, patients had a well-defined infiltrate and only one developed pleural effusion. Mainly, these patients had nonsevere pneumonia; although 10 (55.5%) patients required hospitalization, none required ICU admission and no patients died.

Both serologic samples were obtained from 17 of these patients; however, in 1 patient, only the first sample for termination was available. A fourfold increase in serologic titer was observed in 15 (88.2%) patients; the initial test result was negative in 8 of them. In the remaining 2 patients, both serologic tests gave similar results, 1:128 or greater. However, 8 (44.4%) of the lung aspiration samples were found to be positive by *pneumoniae* PCR. All of the patients with a positive PCR result showed significant increases in the serologic data. Among the ten PCR-negative patients, seven experienced seroconversion, two had standing high titers in both samples, and in one patient only the first sample was available. All the remaining patients with pneumonia due to alternative pathogens, had *pneumoniae* PCR-negative results. In Table 3, results of serologic and PCR tests are compared.

DISCUSSION

In our study, evaluating unselected patients with community-acquired pneumonia, we could establish the etiologic diagnosis in 77 of 93 evaluable cases. A definite finding of recent *M pneumoniae* infection was found in 18 subjects; among these, detection of *M pneumoniae* by PCR, performed in samples obtained directly from lung parenchyma, was possible in 8 cases, showing, in comparison with serologic tests, a sensitivity of 44%. However, no cases with pneumonia caused by other microorganisms were positive in the *M pneumoniae* PCR test; consequently, no false-positive results were found.

One of the most important problems that clinical studies investigating the usefulness of new diagnostic tests for community-acquired pneumonia have presented is the difficulty in making a certain etiologic diagnosis in a high percentage of cases by alternative methods. Consequently, we carefully selected the microbiologic tests used in our study. We did not acc

used samples obtained by invasive techniques as valuable and specific specimens.

Among these techniques, TNA with an ultrathin needle was chosen. This procedure, used by experienced hands, has proved to be a safe technique, acceptable for the patients.¹³ Culture of TNA samples has a very high specificity and a sensitivity of between 40 and 70%.¹⁶⁻¹⁹ The inclusion of additional and also specific diagnostic methods, such as detection of antigens by latex agglutination or specific genomes by PCR, may notably enhance this sensitivity; furthermore, these results do not appear to be modified by prior antibiotic therapy.^{20,21} This selected method allowed us to evaluate more precisely the sensitivity and specificity of *M pneumoniae* PCR diagnostic method performed on TNA samples.

The PCR has already been demonstrated to be useful for detection of *M pneumoniae* for several years.^{10,11} This technique, which has proved to be more sensitive than classic culture or DNA probe methods, is highly specific. Thus, Bernet et al,¹⁰ studying samples obtained from experimentally infected animals, were able to detect between 100 and 1,000 organisms. This level of sensitivity was reduced to one to ten organisms in the study of Buck et al,²² by using simulated clinical specimens. Comparable results, under experimental conditions, have been found by others.¹¹

Unfortunately, experience about this technique applied to clinical samples is still reduced and studies have some limitations. Thus, in comparison with culture and/or serologic tests, PCR seems to have a sensitivity between 70 and 90%.²³⁻²⁷ However, while specificity appeared excellent in experimental studies, positive results of PCR in culture-negative and seronegative patients, even among people without respiratory symptoms, suggests lower specificity.^{23-25,27-29} This finding has been attributed to persistence of *M pneumoniae* in the respiratory tract after acute infection or maybe to the existence of asymptomatic carriers. In front of these studies that used samples collected from the upper respiratory tract, TNA has an additional advantage because the specimen is obtained directly from the infectious locus. It can be hypothesized that this fact could contribute to the elimination of false-positive results, although persistence of *M pneumoniae* in the lungs from guinea pigs inoculated experimentally with *Mycoplasma* has also been reported.¹²

Several target sequences for *M pneumoniae* amplification have been explored showing similar efficacy.^{10,22,23,30,31} In our study, we selected the primers MR5-1 and MP5-2 that had been evaluated extensively by Bernet et al.¹⁰ Their specificity was well demonstrated and no cross-reactivity was detected when the

to be found in the human respiratory tract. Furthermore, these primers are easily available from a commercial supplier.

In our study, discrepancies between both techniques, PCR and the serologic test, were found in ten patients who had serologic evidence of *M pneumoniae* infection but negative PCR results. This apparent insensitivity of PCR could be attributable to different interpretations. Certainly, a sample error is possible because of the reduced volume obtained usually by TNA, particularly in those patients with deeper or smaller infiltrates. Moreover, PCR could still be an imperfect technique, giving negative results because of the presence of unrecognized inhibitors, as some reports showed recently.^{23,32,33} Alternatively, false-positive results of serologic tests could also be a possibility. Thus, among those patients who already had high titers at hospital admission, serologic test results could reflect recent but not current clinical infection, with *M pneumoniae* already absent from the lung parenchyma.^{8,9,25} In addition, cross-reactivity among different mycoplasmal species may also provide false-positive serologic results.³⁴ Finally, despite the high rate and the high specificity of etiologic diagnosis obtained in our study, an upper respiratory tract infection due to *M pneumoniae*, concomitantly with pneumonia caused by an other microorganism, cannot be absolutely excluded. Indubitably, the use of serologic data as the exclusive gold standard has some limitations. It can be suggested that additional information could be obtained from processing TNA specimens for *M pneumoniae* culture: however, we did not perform it. The reasons are multiple: TNA provides a very reduced sample (2 to 3 mL) to be processed simultaneously for many different techniques; sensitivity of cultures appears to be lower than serologic data, particularly if paired serum samples are collected.^{23,25,35} finally, cultures for *M pneumoniae* are difficult, and wide experience in this field is needed.¹²

In summary, the PCR test performed on samples obtained directly from lung parenchyma by TNA appears to be a useful and rapid diagnostic method for *M pneumoniae* infection. Although it may have minor sensitivity than that reported for upper respiratory tract samples, the specificity could be higher by avoiding false-positive results from nasopharyngeal carriers.

REFERENCES

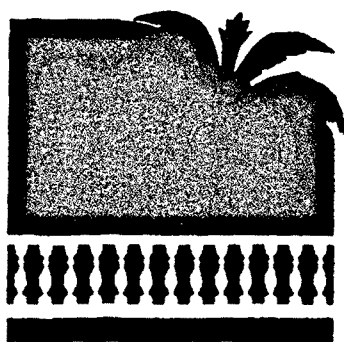
- 1 Tiazon CU, Murray HW. Atypical pneumonias. In: Pennington JE. Respiratory infections: diagnosis and management. 3rd ed. New York: Raven Press, 1994; 407-33
- 2 Mausel JK, Rosenow EC, Smith TF, et al. *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. Chest 1989; 95:639-46
- 3 Pareja A, Bernal C, Leyva A, et al. Etiologic study of patients with community-acquired pneumonia. Chest 1992; 101:1207-10

- 5 Marrie TJ. *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia requiring hospitalization, with emphasis on infection in the elderly. Arch Intern Med 1993; 153:488-94
- 6 Williamson J, Marmion BP, Kok T, et al. Confirmation of fatal *Mycoplasma pneumoniae* infection by polymerase chain reaction detection of the adhesin gene in fixed lung tissue. J Infect Dis 1994; 170:1052-53
- 7 *Mycoplasma pneumoniae*. Lancet 1991; 337:651-52
- 8 Jacobs E. Serological diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections: a critical review of current procedures. Clin Infect Dis 1993; 17(suppl 1):S79-82
- 9 Lee SJ, Charoenying S, Brennan T, et al. Comparative studies of three serologic methods for the measurement of *Mycoplasma pneumoniae* antibodies. Am J Clin Pathol 1989; 92:342-47
- 10 Bernet C, Garret M, de Barbeyrac B, et al. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1989; 27:2492-96
- 11 Jensen JS, Sondergård-Andersen J, Uldum SA, et al. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in simulated clinical samples by polymerase chain reaction. APMIS 1989; 97:1046-48
- 12 Marmion BP, Williamson J, Worswick DA, et al. Experience with newer techniques for the laboratory detection of *Mycoplasma pneumoniae* infection: Adelaide, 1978-1992. Clin Infect Dis 1993; 17(suppl 1):S90-99
- 13 Manresa F, Dorca J. Needle aspiration techniques in the diagnosis of pneumonia. Thorax 1991; 46:601-03
- 14 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. In: Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor, Laboratory Press 1989; 14:18-9
- 15 Kwok SK, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. Nature 1989; 339:237-38
- 16 Falguera M, Nogués A, Ruiz-González A, et al. Transthoracic needle aspiration in the study of pulmonary infections in patients with HIV. Chest 1994; 106:697-702
- 17 Zavala DC, Schoell JE. Ultrathin needle aspiration of the lung in infectious and malignant disease. Am Rev Respir Dis 1981; 123:125-31
- 18 Torres A, Jiménez P, Puig de la Bellacasa J, et al. Diagnostic value of nonfluoroscopic percutaneous lung needle aspiration in patients with pneumonia. Chest 1990; 98:840-44
- 19 Peña Griñán N, Muñoz Lucena F, Vargas Romero J, et al. Yield of percutaneous needle lung aspiration in lung abscess. Chest 1990; 97:69-74
- 20 Bella F, Tort J, Morera MA, et al. Value of bacterial antigen detection in the diagnostic yield of transthoracic needle aspiration in severe community acquired pneumonia. Thorax 1993; 48:1227-29
- 21 Örtqvist A. Community-acquired pneumonia in adults. Curr Opin Infect Dis 1995; 8:93-7
- 22 *Mycoplasma pneumoniae* in simulated clinical specimens: DNA amplification. J Clin Microbiol 1992; 30:3280-83
- 23 Lüneberg E, Jensen JS, Frosch M. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by polymerase chain reaction and nonradioactive hybridization in microtiter plates. J Clin Microbiol 1993; 1088-94
- 24 Williamson J, Marmion BP, Worswick DA, et al. Laboratory agnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection: antigen capture and PCR-gene amplification for detection of the mycoplasma: problems of clinical correlation. Epidemiol Infect 1992; 1:519-37
- 25 van Kuppeveld FJM, Johansson KE, Galama JM, et al. 16S rRNA based polymerase chain reaction compared with culture and serological methods for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994; 13:401-05
- 26 Kai M, Kamiya S, Yabe H, et al. Rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples by the polymerase chain reaction. J Med Microbiol 1993; 38:166-70
- 27 Tjhi JH, van Kuppeveld FJM, Roosendaal R, et al. Direct PCR enables detection of *Mycoplasma pneumoniae* in patients with respiratory tract infections. J Clin Microbiol 1994; 32:11-6
- 28 Skakni L, Sardet A, Just J, et al. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples from pediatric patients by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992; 30:2638-43
- 29 de Barbeyrac B, Bernet-Poggi C, Fébrer F, et al. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium* in clinical samples by polymerase chain reaction. Clin Infect Dis 1993; 17(suppl 1):S83-89
- 30 van Kuppeveld FJM, van der Locht JTM, Angulo AF, et al. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas: 16S rRNA amplification. Appl Environ Microbiol 1992; 58:2606-15
- 31 Garret M, Bonnet J. PCR detection of *M pneumoniae*. In: Peeling DH, Smith DF, Tenover FC, et al, eds. Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. 1st ed. Washington DC: American Society for Microbiology, 1993; 253-56
- 32 Deneer HG, Knight I. Inhibition of the polymerase chain reaction by mucolytic agents. Clin Chem 1994; 40:171-72
- 33 Reznikov M, Blackmore TK, Finlay-Jones JJ, et al. Comparison of nasopharyngeal aspirates and throat swab specimens in polymerase chain reaction-based test for *Mycoplasma pneumoniae*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1995; 14:58-61
- 34 Lind K, Lindhardt BO, Schütten HJ, et al. Serological cross-reactions between *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae*. J Clin Microbiol 1984; 20:1036-43
- 35 Harris R, Marmion BP, Garkanis G, et al. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection: Comparison of methods for the direct detection of specific antigen or nucleic acid sequences in respiratory exudates. Epidemiol Infect 1988; 10:685-94

VI REUNION NACIONAL
DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS
Y MICROBIOLOGIA CLINICA



Sitges, 19-20 de Octubre de 1995



PROGRAMA Y RESUMENES

8.1

INCIDENCIA DE CHLAMYDIA PNEUMONIAE EN LA NEUMONIA DE ADQUISICIÓN COMUNITARIA EN EL AREA DE LLEIDA.

Nogués A¹., Falguera M²., Ruiz A²., Garcia M¹., Barber Y¹., Puig T²., Rivas C¹.

Servicios de Análisis Clínicos-Microbiología¹ y Medicina Interna². Hospital Universitario Arnau de Vilanova, Lleida.

OBJETIVO: Estudiar la incidencia, en nuestro medio, de la infección pulmonar por *Chlamydia pneumoniae*, utilizando, además de los métodos convencionales, técnicas de amplificación del DNA (PCR) sobre muestras obtenidas por punción transtorácica aspirativa (PTA).

METODOS: Desde Enero de 1993 a Marzo de 1994 se estudiaron todos los pacientes adultos llegados al Servicio de Urgencias y diagnosticados clínica y radiológicamente de neumonía. El diagnóstico etiológico se hizo a partir de los resultados obtenidos por hemocultivo y de los obtenidos, a partir de la PTA, por cultivo convencional, cultivo específico para *Legionella pneumophila*, PCR frente a *Ch. pneumoniae*, *Str. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, detección de antígeno capsular de neumococo y/o de los resultados obtenidos por serología. Para el estudio serológico de *Ch. pneumoniae* se utilizó una técnica de microimmunofluorescencia (MIF) por ser más específica que la reacción de fijación del complemento (RFC). La amplificación del DNA se hizo con los primers HLI(GTTGTTTCATGAAGGCCTACT) y HRI(TGGATAACCTACGGTGTGTT) que amplifican un fragmento (Pst1) de 437 pares de bases, específico de *Ch. pneumoniae*.

RESULTADOS: 24 pacientes, de los 126 estudiados, presentaron infección pulmonar por *Chlamydia*: 14 por *Ch. pneumoniae*, 4 por *Ch. psittaci* y 6 por *Chlamydia sp*. La PCR frente a *Ch. pneumoniae* fue positiva en 7 casos, de éstos, 4 tenían serología positiva frente a *Ch. pneumoniae*; en los 3 restantes no se practicó estudio serológico. En los 6 pacientes con infección por *Chlamydia sp* hubo reacción cruzada entre la técnica de MIF frente a *Ch. pneumoniae* y la técnica de RFC frente a *Ch. psittaci*. Tres de los 24 pacientes con infección por *Chlamydia* presentaron infección mixta: *Chlamydia + Str. pneumoniae* (2 casos) y *Chlamydia + Str. viridans* (1 caso). Catorce enfermos precisaron ingreso hospitalario por presentar un cuadro más severo o patología subyacente. Los otros 10, con afectación respiratoria benigna, siguieron tratamiento ambulatorio. Todos los casos evolucionaron favorablemente hacia la curación clínica y radiológica.

El resto de las etiologías fueron: *Str. pneumoniae* (30 casos), *M. pneumoniae* (20 casos), *P. carinii* (8 casos), *H. influenzae* (7 casos), *Influenzavirus* (6 casos), *M. tuberculosis* (3 casos), *C. burnetti* (2 casos), otras etiologías (7 casos).

CONCLUSIONES: *Chlamydia pneumoniae* es un agente importante de neumonía de adquisición extrahospitalaria como agente primario. Su detección por PCR en muestras obtenidas por PTA, junto a la ausencia de otros microorganismos, así lo confirman. La incidencia en nuestro medio estaría alrededor del 11%. Si consideramos los 6 casos de infección por *Chlamydia sp* como correspondientes a *Ch. pneumoniae*, lo que podría ser muy probable, nos acercariamos a una incidencia real del 16%. La falta de datos sobre infección por *Ch. pneumoniae* en años anteriores no nos permite establecer comparaciones.

LETTERS TO THE EDITOR

Who should look after asthma?

The article by Professor Tattersfield and Dr Holmes (June 1995;50:597-9) was full of pertinent and wise statements and observations but we strongly disagree with one or their opinions - namely, that concerning who should look after patients admitted to hospital with severe asthma. They suggest that "... admission under a respiratory physician is likely to be in the patient's interest", but then go on to argue that this may be less good for medical education of juniors and students, implying that asthmatic patients should be admitted to general medical wards rather than specialist units. They also point out that at present there are not enough respiratory physicians. Many audit studies published in the last few years have shown that respiratory physicians deliver a higher quality of inpatient care than do their general physician colleagues. In particular, general physicians prescribe anti-inflammatory treatment less often, are less good at planning to prevent future episodes, and fail to follow up over 40% of cases.¹ A recent article² pointed out that, in cardiac disease, such process measures are probably a more sensitive indicator of standards of care than are direct measures of outcomes, and this conclusion is likely to apply to asthma too since, if asthma prophylaxis is not even prescribed, the patient cannot hope to gain benefit from it.

Tattersfield and Holmes argue that medical students and junior doctors need to see and treat asthma and are fearful that some doctors could fail to learn about it. We agree that all juniors and students need to learn about asthma, but would suggest that it is better that they should rotate through respiratory teams and see a lot of asthma managed well than being exposed to a smattering of asthmatic patients managed in various sub-optimal ways from a range of general medical units. Since respiratory medicine accounts for a quarter of all acute medical admissions,¹ it should be possible to organise for house officer and senior house officer rotations to include the speciality and for all medical students to spend some time in it. We would stress that we are not attacking our general physician colleagues: we accept the reverse logic of our arguments in non-respiratory conditions.

The theme of the editorial is the need for a collaborative approach across the primary/secondary interface and again we agree with this; however, it is likely that most general physicians will have other speciality interests and so will not have either the time or the enthusiasm to develop a rapport with general practitioners for the care of patients with asthma. We believe that the patient's interest must come first and that other interests such as education must be subservient. The "competence and consistency" that Tattersfield and Holmes recommend is only likely to occur if inpatient care of asthmatic subjects is provided by respiratory physicians (ideally with respiratory nurse support) who have

active liaison with their local general practitioner colleagues.

A further reason for our view concerns research not mentioned in the editorial. Advances in the management of this, one of the most important of medical emergencies, will be impaired if patients are scattered amongst all the general physicians and around all the medical wards. There are proportionately many more respiratory cases than there are respiratory physicians but this should not deter us from aiming for the best deal for the patient - even if it means having to strive for more respiratory posts. On call care will have to be shared with others, but the person with the responsibility should be a respiratory physician.

M G PEARSON
B D W HARRISON
Fazakerley Hospital,
Liverpool L9 9AL,
UK

- 1 Pearson MG, Ryland I, Harrison BDW. A national audit of acute severe asthma in adults admitted to hospital. *Quality in Health Care* 1995;4:24-30.
- 2 Mant J, Hicks N. Detecting differences in quality of care: the sensitivity of measures of process and outcome in treating acute myocardial infarction. *BMJ* 1995;311:793-6.
- 3 Pearson MG, Litterer J, Davies PDO. An analysis of medical workload by speciality and diagnosis in Mersey: evidence of patient to specialist mismatch. *J R Coll Phys* 1994;28:230-4.

Community-acquired *Chlamydia pneumoniae* pneumonia

The study by Dr Kauppinen and colleagues (February 1996;51:185-9) contains two interesting clinical aspects: (1) *Chlamydia pneumoniae* caused pneumonia frequently in association with other microorganisms, mainly *Streptococcus pneumoniae*; and (2) the course of this infection was unrelated to the use of appropriate antimicrobial treatment. In addition, asymptomatic carriers have been found by others.¹ All these findings might question the role of *C. pneumoniae* as a pathogenic agent responsible for community-acquired pneumonia.

We recently performed a study to determine the aetiology of community-acquired pneumonia in Lleida (Spain). Traditional diagnostic methods, including paired serum samples for microimmunofluorescence to detect *C. pneumoniae*, were used in combination with polymerase chain reaction (PCR) tests performed on samples obtained directly from lung parenchyma by transthoracic needle aspiration to avoid confounding results. PCR has improved the ability to detect many microbial agents, including *C. pneumoniae*, with a higher sensitivity and specificity than conventional procedures.² Furthermore, transthoracic needle aspiration is a very specific method of obtaining uncontaminated pulmonary samples.

With this method 14 of 119 patients (12%) had a diagnosis of *C. pneumoniae* pneumonia. Serological criteria established the diagnosis in 11 cases and PCR in seven (both methods were positive in four patients). Of these patients three had a dual infection, associated with *S. pneumoniae* in two cases and *S. viridans* in one. The outcome of the patients was retrospectively evaluated in correlation with

the treatment; seven received β -lactam agents only and seven received macrolides, alone or combined with β -lactams. The clinical course of the illness (duration of fever, time in hospital, and incidence of complications) did not differ between the two groups.

We found *C. pneumoniae* in the lung parenchyma of our patients with pneumonia using specific methods, and the clinical results were comparable with those of Kauppinen. Thus, we believe that *C. pneumoniae* is a real pathogen which causes pneumonia. Furthermore, we support the opinion that chlamydial infections can be successfully treated with alternative regimens, particularly β -lactam agents. Prospective studies are needed to explore this possibility.

M FALGUERA
A NOGUES
A RUIZ-GONZALEZ
Hospital Arnau de Vilanova,
25006 Lleida,
Spain

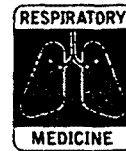
- 1 Hyman CL, Roblin PM, Gaydos CA, Quinn TC, Schachter J, Hammerschlag MR. Prevalence of asymptomatic nasopharyngeal carriage of *Chlamydia pneumoniae* in subjectively healthy adults: assessment by polymerase chain reaction-enzyme immunoassay and culture. *Clin Infect Dis* 1995;20:1174-8.
- 2 Black CM, Fields PI, Messmer TO, Berdal BP. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in clinical specimens by polymerase chain reaction using nested primers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:752-6.

Fibreoptic bronchoscopy for diagnosis of isolated tuberculous mediastinal lymphadenopathy

We read with interest the report by Baran *et al* (January 1996;51:87-9) on the role of rigid bronchoscopy in the diagnosis of intrathoracic tuberculous lymphadenopathy without parenchymal lesions in a series of 17 adults. Fifteen patients (88%) were found to have various endobronchial abnormalities. Bronchial or transbronchial biopsy specimens were diagnostic in nine (53%). The authors attributed this high diagnostic yield to the use of wide bore needles with the rigid bronchoscope.

We recently reported similar results in a series of 12 HIV negative adults with isolated tuberculous mediastinal lymphadenopathy using fibreoptic bronchoscopy.¹ Isolated tuberculous mediastinal lymphadenopathy was defined as mediastinal lymphadenopathy as the sole detectable manifestation of tuberculosis with negative smear sputum examination. Endobronchial abnormalities were present in nine patients (75%): tracheal, main or segmental bronchus extrinsic compression in eight; tracheal, main or segmental bronchus mucosal inflammation contiguous to an enlarged lymph node in four; endobronchial inflammatory mass contiguous to an enlarged hilar lymph node in three; and endobronchial node fistulisation in three. Diagnosis was obtained by bronchial biopsy in seven cases (58%), mediastinoscopy in four, and computed tomographic-guided transthoracic needle aspiration in one. None of our patients underwent transbronchial biopsy.

This high diagnostic yield of bronchoscopy in patients with isolated tuberculous media-



Rapid detection of pneumococcal antigen in lung aspirates: comparison with culture and PCR technique

A. RUIZ-GONZÁLEZ*, A. NOGUÉS†, M. FALGUERA*, J. M. PORCEL*, E. HUELIN* AND M. RUBIO-CABALLERO*

Departments of *Internal Medicine, †Microbiology and ‡Emergencies, University Hospital Arnau de Vilanova, Lleida, Spain

Detection of pneumococcal antigen has been used to increase the rate of diagnosis of pneumococcal pneumonia. The present study was designed to determine the value of rapid detection of pneumococcal antigen in samples obtained by transthoracic needle aspiration (TNA) from patients with community-acquired pneumonia (CAP) in a comparative analysis with culture and polymerase chain reaction (PCR). Pneumococcal antigen was detected by latex agglutination. One hundred and ten consecutive patients diagnosed with CAP underwent TNA. Patients were grouped, according to PCR, culture and serological results, into pneumococcal pneumonia ($n=18$), other known aetiology ($n=67$) and unknown aetiology ($n=25$). In patients with pneumococcal pneumonia, antigen was detected in 17 (94.4%) cases. Antigen was detected in one and nine patients with pneumonia of other known or unknown aetiologies, respectively, yielding a specificity of 89.1%. In conclusion, detection of pneumococcal antigen on samples obtained by TNA from patients with CAP provides a sensitive and specific diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infection. Furthermore, its rapid results would reduce the dependence on empirical treatments.

RESPIR. MED. (1997) 91, 201-206

Introduction

Streptococcus pneumoniae is a major causative agent of community-acquired pneumonia (CAP) in most series (1). Diagnostic methods currently available include examination of blood and sputum. A positive blood culture provides the basis for a specific aetiological diagnosis, but its sensitivity is low (2). The use of sputum Gram's stain and culture is of uncertain value. The ability of a sputum Gram's test to predict sputum culture recovery of pneumococci varies widely with the criteria used to define a positive Gram's stain (3). In addition, Gram's stain findings have not been correlated with alveolar

cultures in a large number of CAP patients (4). Sputum culture also has its limitations, and when an organism is recovered with this test, it is often impossible to know if the organism is an infecting pathogen or a colonizer (5).

Clinicians are interested in rapid microbiologic methods that provide a specific aetiological diagnosis, in spite of prior antibiotic therapy (6). Some of this interest has been focused on the detection of antigens presented by the pathogens. The development of pneumococcal antigen detection tests have proved a good correlation with culture of blood and sputum, and provide rapid results which do not seem to be modified by prior antibiotic therapy (7). However, antigen detection in blood or sputum are of limited value in both non-bacteraemic patients and non-sputum producers.

The need for diagnostic procedures that by-pass the oropharyngeal tract has allowed a re-evaluation of transthoracic needle aspiration

Received 1 December 1995 and accepted in revised form 10 April 1996.

Correspondence should be addressed to: A. Ruiz-González, Department of Internal Medicine, University Hospital Arnau de Vilanova, Alcalde Rovira Roure, 80, 25006 Lleida, Spain.

(TNA), a technique which seems to be specific, safe and cost-effective (8). In a low number of patients with CAP, some authors have reported a good correlation between pneumococcal antigen detection and culture performed on samples obtained by TNA (9).

In a comparative study with culture and PCR, the present authors have investigated the ability of agglutination test to detect *S. pneumoniae* capsular antigen in samples obtained by TNA.

Methods

The study population consisted of 118 consecutive and non-selected patients admitted at emergency room with CAP. Community-acquired pneumonia was defined as an acute febrile illness with transient shadows on the chest radiography. One hundred and ten patients out of 118, without major contraindications (coagulation disorders, untreatable cough or the presence of bullae), underwent TNA. Trans-thoracic needle aspiration was performed by a technique described previously (10) using an ultrathin needle (25 G Spinocan-R) at the patient's bedside with neither radiosopic guidance nor pre-medication. An expiratory chest radiography was performed 2 h later to exclude pneumothorax. In all patients, two blood cultures at admission and serological tests (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Legionella pneumophila*, *Coxiella burnetti* and *Influenza A* virus) at Weeks 1 and 4 were carried out. A four-fold or greater increase in IgG antibody titre or, alternatively, a stable IgG titre ≥ 512 by immunofluorescence (*M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* and *L. pneumophila*) or ≥ 20 by complement fixation test (*C. psittaci*, *C. burnetti*, *Influenza A* virus) were considered diagnostic.

The sample obtained by TNA was sent to the bacteriology laboratory and processed by the following methods:

(1) Twenty-five microlitres were boiled and centrifuged for 3 min. Capsular pneumococcal antigens were investigated by a latex agglutination test. Antisera for *S. pneumoniae* (Slidex Meningite Kit; Bio-Merieux, Marcy l'Etoile, France) were used. Positive and negative controls were used in each determination.

(2) A total of 0.5 ml was washed three times with distilled water in order to obtain total lysis of red blood cells. Subsequently, the sample was centrifuged and the pellet was re-suspended in 300 μ l lysis buffer (0.01 M Tris HCl, pH 7.8, 0.005 M EDTA) and incubated for 1 h at 37°C with 0.5% sodiumdodecyl sulphate (SDS) and 1.5 μ l of proteinase K. The sample was subsequently mixed with 400 μ l phenol-chloroform and centrifuged at 12.000 rpm for 5 min in order to separate organic and aqueous phases. The sample was placed in a 1.5 ml tube, precipitated with 0.6 volumes of isopropyl alcohol and incubated for 10 min at room temperature. Further, the tube was centrifuged at 12.000 rpm for 10 min, and the sample was decanted and washed with 70% ethanol; it was then centrifuged at 12.000 rpm for 10 min and the supernatant was removed. Finally, DNA was re-suspended in 100 μ l distilled water. For DNA amplification, the primer set Pn2x up (CGT GGG ACT ATT TAT GAC CGA AAT GG) and Pn2x down (AAT TCC AGC ACT GAT GGA AAT AAA CAT ATT A) were used, that amplified the PBP 2x gene of *S. pneumoniae* as described previously (11). The amplification was performed in a thermocycler (Mod. IHB2024, Cherlyn Electronics Ltd., Cambridge, U.K.), heating the sample one cycle at 95°C for 4 min, then 40 cycles at 95°C for 1.5 min at 56°C for 1.5 min and at 72°C for 6 min, and finally, one cycle at 70°C for 10 min. The amplified product was analysed by 3% agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining, and examined by ultra-violet transillumination. To prevent contamination, a strict spatial separation of the different technical steps involved in polymerase chain reaction (PCR) was maintained during the process, and the recommendations of Kwok and Higuchi were followed (12). Positive and negative controls were used in each determination.

SENSITIVITY OF PCR

Serial dilutions of 150, 100, 54, 11 and 5 cfu ml⁻¹ *S. pneumoniae* in both blood-agar and TNA samples were tested by PCR. The test was positive at all dilutions in blood-agar, whereas it was positive on 150, 100, 54 and 5 cfu ml⁻¹ *S. pneumoniae* dilution and negative at 11 cfu ml⁻¹ *S. pneumoniae* dilution.

TABLE 1. Diagnostic yield in 110 patients with community-acquired pneumonia who underwent transthoracic needle aspiration

Known aetiology	85 (77.2%)
<i>Chlamydia</i> spp	22 (20%)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	18 (16.3%)
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	18 (16.3%)
<i>Pneumocystis carinii</i>	7 (6.3%)
Influenza A virus	7 (6.3%)
<i>Haemophilus influenzae</i>	6 (5.4%)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3 (2.7%)
<i>Coxiella burnetti</i>	2 (1.8%)
<i>Streptococcus viridans</i>	1 (0.9%)
<i>Enterococcus faecium</i>	1 (0.9%)
Unknown aetiology	25 (22.8%)

(3) The remaining sample was investigated for special pathogens by standard techniques (13).

The diagnosis of pneumococcal pneumonia was made on the basis of at least one of the following: (1) positive blood culture; (2) positive TNA culture; and (3) positive PCR test on TNA sample.

The rapid results of latex agglutination guided the antibiotic therapy. If positive, penicillin at standard dosage was added; if negative, epidemiological features and clinical situation of the patient guided the choice of antibiotic.

This study was approved by the Ethics Committee of the hospital, and guidelines for human experimentation from the Spanish Department of Health were followed. In addition, informed consent was obtained from the patients.

Results

An aetiological diagnosis was established in 85 (77.2%) patients as shown in Table 1. *Streptococcus pneumoniae* was considered responsible in 18 (16.3%) patients. There were 12 men and six women of mean age of 56.7 years (range 26–87). Eleven (61.1%) patients had underlying disease (AIDS in five patients, lung cancer in four patients, chronic bronchitis in one patient, and dementia in one patient). AIDS patients had a mean CD4+ lymphocytes count of 151 mm⁻³ (range 5–430). Before admission, seven (38.8%) of the patients had received antibiotic treatment.

TABLE 2. Results of diagnostic tests performed on 18 patients with pneumococcal pneumonia

Patient no.	Blood culture	TNA culture	TNA PCR test	TNA antigen detection
1	+	+	+	+
2	-	-	+	+
3	-	+	+	+
4	-	-	+	+
5	-	-	+	+
6	-	+	+	+
7	-	+	+	+
8	-	-	+	+
9	+	-	-	+
10	+	+	+	+
11	+	-	-	+
12	-	-	+	+
13	+	-	+	+
14	+	-	+	+
15	-	-	+	+
16	+	+	+	+
17	+	-	-	-
18	+	+	+	+

TNA, transthoracic needle aspiration; PCR, polymerase chain reaction.

Eight of them (44.4%) had respiratory failure ($PaO_2 \leq 60$ mmHg), but none underwent mechanical ventilation. An 81-year-old patient with severe pneumonia and without evidence of pneumothorax in relation to TNA died within 24 h of admission.

Table 2 shows the results of the diagnostic tests in patients with pneumococcal pneumonia. Blood culture, TNA culture, PCR and antigen detection tests were positive in 9, 7, 15 and 17 cases, respectively. Evidence of pneumococcal infection by either culture and/or PCR was found in 18 of the cases, and in 17 of these, the antigen detection test was positive, yielding a sensitivity of 94.4%.

In 66 of 67 patients with pneumonia caused by other known micro-organisms, the antigen detection test was negative. One patient with serologic evidence of *C. pneumoniae* infection had a positive result of the antigen detection test. In nine (36%) of 25 patients with pneumonia of unknown aetiology, the result of

the agglutination test was positive, and they were all treated with penicillin. The specificity was then calculated as 89.1%.

Complications from TNA procedure were seen in eight (7%) cases; three (2.6%) patients developed pneumothorax less than 20% (pleural drainage was not required), and five (4.4%) patients had mild-autolimited haemoptysis.

Discussion

Antigen detection tests have been widely used in a variety of body fluids in clinical studies (7). The frequency of a positive pneumococcal antigen test in pneumococcal pneumonia varies considerably depending on both the body fluid investigated and the antigen detection method performed. Sensitivities have ranged between 40–99, 9–76 and 5–76% in sputum, serum and urine samples, respectively (14–19). Latex agglutination (LA) and co-agglutination (COA) techniques are about 5–10 times more sensitive *in vitro* than countercurrent immunoelectrophoresis (CIE) (20), and ELISA technique is *c.* 5–10 times more sensitive than agglutination methods, but batch processing is necessary on economic grounds, the test is time-consuming, and non-specific reactivity has been troublesome, especially with urine specimens (21).

The conclusion from these studies is that pneumococcal antigen is most often found in sputum. However, the diagnostic specificity of pneumococcal antigens found in sputum is uncertain. As with sputum culture, expectorated samples could conceivably be contaminated by antigens derived from *S. pneumoniae* colonizing the oropharynx. It has been shown that in the absence of active lower respiratory tract infection, oropharyngeal organisms produce antigens in saliva, giving positive pneumococcal antigen reactions in 20% of healthy volunteers (7).

The diagnostic specificity for pneumococcal infection of pneumococcal antigens in serum, urine or pleural effusion is undoubted. However, not all patients with pneumococcal pneumonia become antigenaemic, thereby limiting the sensitivity. Boersma *et al.* (22) performed pneumococcal antigen test on pleural fluid from 33 patients with CAP. The test was positive in 89% of cases with pneumococcal pneumonia.

However, pneumonia due to *S. pneumoniae* are associated with parapneumonic effusion in only 40% of cases (23). Recently, pneumococcal antigen tests have been investigated on samples obtained by invasive techniques. Jiménez *et al.* (24) have performed the LA test on bronchoalveolar lavage samples from 59 patients with CAP. Pneumococcal antigen was detected in 54% of pneumococcal pneumonia cases, and no false positive results were found. Unfortunately, bronchoscopy is uncomfortable for the patient, and specialized personnel is required (25). Therefore, TNA appears to be a cost-effective method to obtain uncontaminated samples from lung parenchyma (26), and in the present study it was performed in 110 (93.2%) of 118 unselected patients with CAP. Recently (9), 12 patients with pneumococcal pneumonia underwent TNA, and the pneumococcal antigen detection test was positive in 10 (83.3%) without false positive results. In the present study, 17 of 18 pneumococcal pneumonia cases had a positive antigen test, yielding a sensitivity of 94.4%. In 67 patients with pneumonia caused by a microorganism other than *S. pneumoniae*, the agglutination test was positive in only one patient. In this patient, acute and convalescence antibody titres were considered to be diagnostic for *C. pneumoniae* infection. However, the results of a recent study using PCR techniques (27) raised a concern about the specificity of serology for diagnosing active infection with *C. pneumoniae*, since 18% of asymptomatic patients had diagnostic antibody titres indicating acute infection. Otherwise, evidence of mixed infections has already been described (28–30), and this possibility could be existent in the above patient.

In up to 50% of patients with CAP, the microbial aetiology is never determined. It has been postulated that other agents causing pneumonia remain to be discovered (1). Alternatively, it has been suggested that most patients with pneumonia of unknown aetiology have pneumococcal pneumonia (31). The present results are in accordance with the latter explanation, since 36% of the study patients with pneumonia of unknown aetiology had pneumococcal antigen detected in TNA samples, and they were all cured when penicillin was added. Similarly, Jiménez *et al.* (24) found that the test was positive in 53% of cases with pneumonia of

unknown aetiology, from samples obtained by bronchoscopy.

In this regard, some of the PCR negative results could have been false negative results. The sensitivity with which PCR amplifies *S. pneumoniae* DNA varies to the primers used, the body fluid studied and the ability to remove the polymerase inhibitors from the sample. Thus, the sensitivity of PCR was 63–100% when the product amplified was the pneumolysin gene, and 75% when the autolysin gene was used in blood cultures (32,33). In sputum, PCR has demonstrated a 93% correlation with sputum culture (bacterial counts of 10^7 cfu ml⁻¹) (34). In addition, the incomplete removal of DNA polymerase inhibitors may constitute an explanation for variable PCR results (35) and the present PCR results *in vitro* (see Methods).

In summary, these data demonstrate the possibility to detect *S. pneumoniae* antigen on TNA samples with a high sensitivity, and accumulating evidence suggests that the specificity is good. Furthermore, the rapid result would reduce the dependence on empirical antimicrobial treatments.

References

1. Fang G, Fine M, Orloff J *et al.* New and emerging etiologies for community-acquired pneumonia with implications for therapy. A prospective multicenter study of 359 cases. *Medicine (Balt)* 1990; **69**: 307–316.
2. Research Committee of British Thoracic Society and Public Health Laboratory Service. Community-acquired pneumonia in adults in British hospitals 1982–1983: a survey of aetiology, mortality, prognostic factors and outcome. *Q J Med* 1987; **239**: 195–220.
3. Rein MF, Gwaltney JM, O'Brien WM *et al.* Accuracy of Gram's stain in identifying pneumococci in sputum. *JAMA* 1978; **239**: 2671–2673.
4. Niederman MS, Bass JB Jr, Campbell GD *et al.* Guidelines for the initial management of adults with community-acquired pneumonia: diagnosis, assessment of severity, and initial antimicrobial therapy. *Am Rev Respir Dis* 1993; **148**: 1418–1426.
5. Lentino JR, Lucks DA. Nonvalue of sputum culture in the management of lower respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* 1987; **25**: 758–762.
6. Ausina V. Rapid laboratory diagnostic methods in respiratory infections. *Curr Opin Infect Dis* 1989; **2**: 541–546.
7. Venkatesan P, Macfarlane JT. Role of pneumococcal antigen in the diagnosis of pneumococcal pneumonia. *Thorax* 1992; **47**: 329–331.
8. Zalacaín R, Llorente L, Gaztelurrutia L *et al.* Punción transtorácica aspirativa con aguja ultrafina en neumonías de alto riesgo adquiridas en la comunidad. *Med Clin (Barc)* 1993; **100**: 567–570.
9. Bella F, Tort J, Morera MA, Espauella J, Armengol J. Value of bacterial antigen detection in the diagnostic yield of transthoracic needle aspiration in severe community-acquired pneumonia. *Thorax* 1991; **46**: 1227–1229.
10. Manresa F, Dorca J. Needle aspiration techniques in the diagnosis of pneumonia. *Thorax* 1991; **46**: 601–603.
11. Dowson CG, Hutchinson A, Spratt BG. Extensive remodelling of the transpeptidase domain of penicillin-binding protein 2B of a penicillin-resistant South African isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 1989; **3**: 95–102.
12. Kwok SK, Higuchi R. Avoiding false positivities with PCR. *Nature (London)* 1989; **339**: 237–238.
13. Ballows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ. *Manual of Clinical Microbiology* (5th edn). Washington: American Society for Microbiology, 1991.
14. Farrington M, Rubenstein D. Antigen detection in pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* 1991; **23**: 109–116.
15. Örtqvist A, Jönsson I, Kalin M, Krook A. Comparison of three methods for detection of pneumococcal antigen in sputum of patients with community-acquired pneumonia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989; **8**: 956–961.
16. Boersma WG, Löwenberg A, Holloway Y, Kutschrütter H, Snidjer JAM, Koëter GH. Pneumococcal capsular antigen detection and pneumococcal serology in patients with community-acquired pneumonia. *Thorax* 1991; **46**: 902–906.
17. Macfarlane JT, Finch RG, Ward MJ, Macrae AD. Hospital study of adult community-acquired pneumonia. *Lancet* 1982; **ii**: 255–258.
18. Coonrod JD, Drennan DP. Pneumococcal pneumonia: capsular antigenaemia and antibody responses. *Ann Intern Med* 1976; **84**: 254–260.
19. Tugwell P, Greenwood PM. Pneumococcal antigen in lobar pneumonia. *J Clin Pathol* 1975; **25**: 118–123.
20. Harding SA, Brown DC. *Streptococcus pneumoniae*. In: Kohler RB, ed. *Antigen Detection to*

- Diagnose Bacterial Infections*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1986, pp. 27–38.
21. Doskeland SO, Berdal BP. Bacterial antigen detection in body fluids: methods for rapid antigen concentration and reduction of non-specific reactions. *J Clin Microbiol* 1980; **11**: 380–384.
 22. Boersma WG, Löwenberg A, Holloway Y, Kutttschrütter H, Snidjer JAM, Koëter GH. Rapid detection of pneumococcal antigen in pleural fluid of patients with community-acquired pneumonia. *Thorax* 1993; **48**: 160–162.
 23. Light RW, Girard WM, Jenkinson SG, George RB. Parapneumonic effusions. *Am J Med* 1980; **69**: 507–511.
 24. Jiménez P, Meneses M, Saldías F, Velásquez M. Pneumococcal antigen detection in bronchoalveolar lavage fluid from patients with pneumonia. *Thorax* 1994; **49**: 872–874.
 25. Khan FW, Jones JM. Diagnosing bacterial respiratory infections by bronchoalveolar lavage. *J Infect Dis* 1987; **155**: 862–869.
 26. Falguera M, Nogués A, Ruiz-González A, García M, Puig T, Rubio-Caballero M. Trans-thoracic needle aspiration in the study of pulmonary infections in patients with AIDS. *Chest* 1994; **106**: 697–702.
 27. Gaydos CA, Roblin PM, Hammerschlag MR *et al.* Diagnostic utility of PCR-enzyme immunoassay, culture and serology for detection of *Chlamydia pneumoniae* in symptomatic and asymptomatic patients. *J Clin Microbiol* 1994; **32**: 903–905.
 28. Örtqvist A, Hedlund J, Grillner L *et al.* Aetiology, outcome and prognostic factors in community-acquired pneumonia requiring hospitalization. *Eur Respir J* 1990; **3**: 1105–1113.
 29. Brown RB, Sands M, Ryczak M. Community-acquired pneumonia caused by mixed aerobic bacteria. *Chest* 1986; **90**: 810–814.
 30. Almirall J, Morato I, Riera F *et al.* Incidence of community-acquired pneumonia and *Chlamydia pneumoniae* infection: a prospective multicentre study. *Eur Respir J* 1993; **6**: 14–18.
 31. Farr BM, Kaiser DL, Harrison BDW, Connolly CK. Prediction of microbial etiology at admission to hospital for pneumonia from the presenting clinical features. *Thorax* 1989; **44**: 1031–1035.
 32. Rudolph KM, Parkinson AJ, Black CM, Mayer W. Evaluation of polymerase chain reaction for diagnosis of pneumococcal pneumonia. *J Clin Microbiol* 1993; **31**: 2661–2666.
 33. Hassang-king M, Baldeh I, Secka O, Falade A, Greenwood B. Detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in blood cultures by PCR. *J Clin Microbiol* 1994; **32**: 1721–1724.
 34. Gillespie SH, Ullman C, Smith MD, Emery V. Detection of *Streptococcus pneumoniae* in sputum samples by PCR. *J Clin Microbiol* 1994; **32**: 1721–1724.
 35. Higuchi R. Simple and rapid preparation of samples for PCR. In: Erlich HA, ed. *PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification*. New York: Stockton Press, 1988, pp. 31–38.



EXCLÒS DE PRÉSTEC