

NEUMONÍA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD

Rentabilidad diagnóstica de las técnicas de detección de antígeno y genoma bacteriano en muestras obtenidas por punción transtorácica aspirativa

Agustín Ruiz González

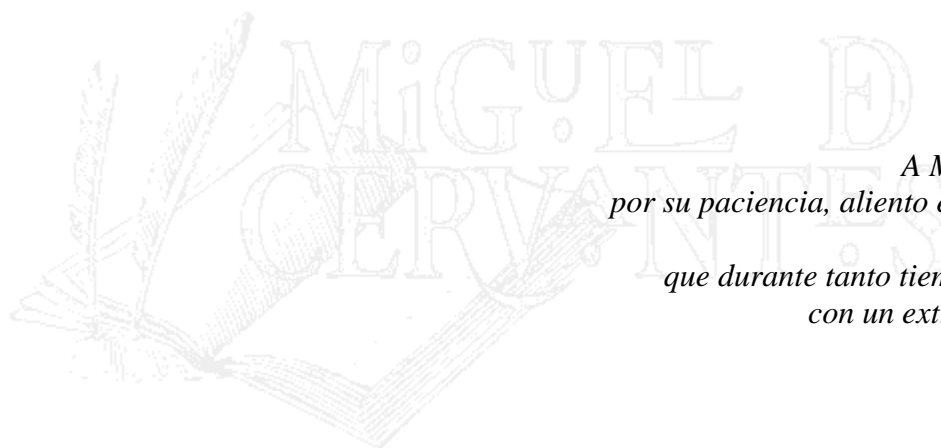
I S B N: 84-89727-64-3

Depósito Legal: S. 54-98

Servei de Publicacions
Universitat de Lleida

TESITEX, S.L.
c/. Melchor Cano, 15
Télf. 923 - 25 51 15
Fax 923 - 25 87 03
37007 SALAMANCA

BIBLIOTECA VIRTUAL



*A Mari Carmen,
por su paciencia, aliento e inspiración.*

*A Ainhoa,
que durante tanto tiempo ha vivido
con un extraño en casa.*

Índice general

[Agradecimientos](#)

[Abreviaturas](#)

[A\) Introducción](#)

[1. Neumonía adquirida en la comunidad](#)

[2. Epidemiología de la NAC](#)

[2.1. Estudios epidemiológicos](#)

[2.2. Microbiología de la NAC](#)

[2.2.1. Streptococcus pneumoniae](#)

[2.2.2. Mycoplasma pneumoniae](#)

[2.2.3. Chlamydia pneumoniae](#)

[2.2.4. Legionella pneumophila](#)

[2.2.5. Haemophilus influenzae](#)

[2.2.6. Klebsiella pneumoniae](#)

[2.2.7. Staphylococcus aureus](#)

[2.2.8. Coxiella Burnetti](#)

[2.2.9. Virus](#)

[3. Pronóstico de la NAC](#)

[4. Tratamiento de la NAC](#)

[5. Técnicas diagnósticas en la NAC](#)

[5.1 Técnicas de diagnóstico clínico](#)

[5.2. Técnicas de diagnóstico microbiológico](#)

[5.2.1. Técnicas relativas a la obtención de muestras](#)

[5.2.1.1. Técnicas no invasivas](#)

[5.2.1.2. Técnicas invasivas](#)

[5.2.2. Técnicas relativas al procesamiento de muestras](#)

[5.2.2.1. Detección de antígenos bacterianos](#)

[5.2.2.2. Técnica de detección de genoma bacteriano por reacción en cadena de la polimerasa \(PCR\)](#)

[B\) Objetivos del estudio](#)

[C\) Material y métodos](#)

[1. Población a estudiar](#)

[1.1. Criterios de inclusión en el estudio](#)

[1.2. Parámetros clínicos analizados](#)

[2. Obtención de muestras clínicas](#)

[2.1. Muestras clínicas habituales](#)

[2.2. Muestra obtenida por punción transtorácica aspirativa](#)

[3. Procesamiento de muestras obtenidas](#)

[3.1. Procesamiento de muestras habituales](#)

[3.2. Procesamiento de muestras obtenidas por PTA](#)

[3.2.1. Métodos convencionales](#)

[3.2.2. Técnica de detección de antígenos](#)

[3.2.3. PCR](#)

[4. Criterios diagnósticos](#)

[4.1 Criterios de diagnóstico clínico](#)

[4.2. Criterios de diagnóstico microbiológico](#)

[5. Análisis estadístico](#)

[D\) Resultados](#)

[1. Características de la población estudiada](#)

[2. Resultados microbiológicos](#)

[2.1. Generalidades](#)

[2.2. Resultados de los métodos convencionales](#)

[2.3. Resultados de la PTA](#)

[2.3.1. Generalidades](#)

[2.3.2. Resultados de las tinciones y cultivos en la PTA](#)

[2.3.3. Resultados de la técnica de detección de antígenos bacterianos en la PTA](#)

[2.3.4. Resultados de la técnica de detección de genoma bacteriano por PCR](#)

2.3.5. Yatrogenia de la PTA

3. Estudio comparativo de los resultados de las diversas técnicas microbiológicas empleadas

3.1. Neumonía por Streptococcus pneumoniae

3.2. Neumonía por microorganismos del género Chlamydia

3.3. Neumonía por Mycoplasma pneumoniae

3.4. Neumonía por Haemophilus influenzae

3.5. Neumonía por Pneumocystis carinii

3.6. Neumonía por otros microorganismos

3.7. Visión global de los resultados de las diversas técnicas microbiológicas empleadas

4. Cálculo de la eficacia diagnóstica de las nuevas técnicas microbiológicas

4.1. Eficacia diagnóstica de la determinación de antígenos bacterianos

4.2. Eficacia diagnóstica de la PCR

5. Aportación diagnóstica de los nuevos métodos de diagnóstico microbiológico a la PTA

6. Aportación diagnóstica de la PTA en el estudio etiológico de la NAC

E) Discusión

1. Características generales del estudio

2. Características de la NAC de Lleida

2.1. Generalidades

2.2. Microorganismos implicados en la NAC de Lleida

3. Valoración de los resultados obtenidos con los nuevos métodos microbiológicos

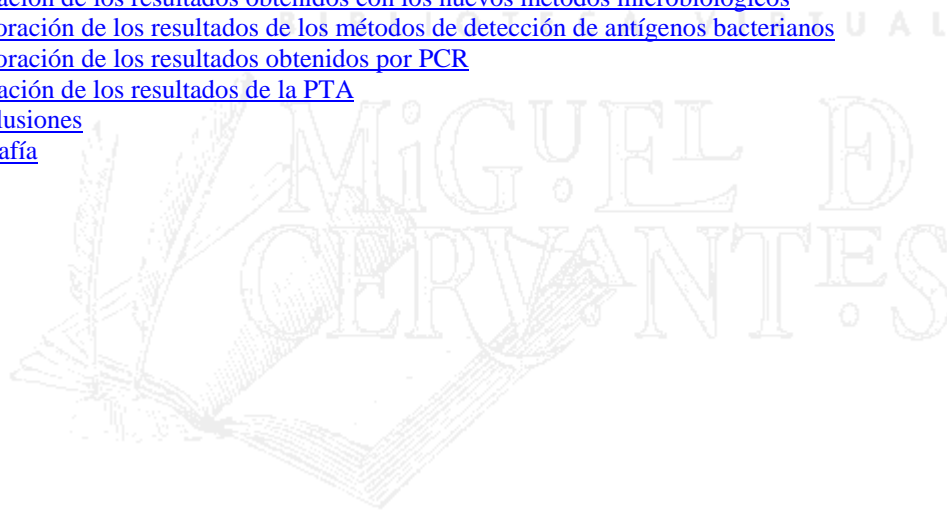
3.1. Valoración de los resultados de los métodos de detección de antígenos bacterianos

3.2. Valoración de los resultados obtenidos por PCR

4. Valoración de los resultados de la PTA

F) Conclusiones

Bibliografía



Agradecimientos

- * A los profesores Manuel Rubio y, muy especialmente, Miquel Falguera por asumir la dirección de esta Tesis Doctoral y prestarme toda la ayuda necesaria para su consecución.
- * Al Dr. Antoni Nogués por convertir en triviales las dificultades técnicas en Microbiología.
- * Al personal del Servicio de Análisis Clínicos y Microbiología del Hospital Arnau de Vilanova de Lleida por su desinteresada colaboración en el procesamiento de muestras clínicas.
- * A los médicos adjuntos del Servicio de Medicina Interna, a todos los médicos residentes y al personal que trabaja en Urgencias del hospital Arnau de Vilanova de Lleida por su desinteresada colaboración en la recogida de muestras clínicas.

Abreviaturas

NAC Neumonía adquirida en la comunidad

PTA Punción transtorácica aspirativa

MCD Métodos convencionales de diagnóstico

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

CMI Concentración mínima inhibitoria

SIDA Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

EPOC Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

BAL Lavado broncoalveolar

PTT Punción transtraqueal

A) Introducción

1. Neumonía adquirida en la comunidad

La neumonía adquirida en la comunidad (NAC) constituye una entidad en estrecha relación con el clínico. Por no ser una enfermedad de declaración obligatoria resulta difícil encontrar una equivalencia numérica para esta afirmación. Woodhead y colaboradores (1987), estiman que un médico general asiste a una media de 10 casos por cada 1000 habitantes y año. En nuestro país, dos estudios realizados recientemente (Almirall et al, 1993 y Aguirre et al, 1993), arrojan una incidencia de 2.6 y 8.8 casos por 1000 adultos y año, respectivamente.

El desarrollo de la terapéutica antimicrobiana, iniciado en la década de los cuarenta con el descubrimiento de la penicilina, mejoró de manera espectacular la supervivencia por neumonía neumocócica (del 17% al 85%) (Pennington, 1994), lo cual condujo a la abdicación de la neumonía como "**Captain of the men of death**" (Osler, 1901); esto ha permitido que, en la actualidad, tres de cada cuatro casos de NAC puedan ser tratados correctamente de manera ambulatoria (Garibaldi, 1985).

Cifras tan optimistas para la población general quedan ensombrecidas cuando centramos nuestra atención sobre la población anciana, donde la NAC constituye la primera causa de muerte por infección. El hecho de que el 90% de los pacientes con NAC y edad superior a los 65 años requieran hospitalización, con un tiempo de estancia medio dos veces superior al de los adultos (Fedullo, 1985), junto con el envejecimiento progresivo de la población, han permitido que la NAC se convierta de nuevo en un problema sanitario de creciente actualidad.

La tasa de mortalidad de la NAC -aunque baja- ha permanecido invariable a lo largo de los últimos treinta años, situándose alrededor del 15% para los casos que requirieron hospitalización (Tabla 1-1). La tasa de mortalidad para los pacientes atendidos en unidades de vigilancia intensiva alcanza el 54% (Woodhead et al, 1985).

Series	Casos	Mortalidad
Austrian, 1964	1130	13
Mufson, 1967	427	10
Sullivan, 1972	292	24
Dorff, 1973	148	17.5
Ebright, 1980	106	13
MacFarlane, 1982	127	15
Marrie, 1989	719	21
Pachón, 1990	67	20.8

Tabla 1-1. Mortalidad por neumonía adquirida en la comunidad

En consecuencia, la existencia de una posible evolución fatal genera una sensación de urgencia que acompaña al clínico cada vez que se enfrenta con una NAC. Sensación más acentuada si cabe, en el anciano, en quien una acción terapéutica en las primeras veinticuatro horas puede ser crítica en la posterior evolución de la enfermedad (Pennington, 1994).

2. Epidemiología de la NAC

2.1. Estudios epidemiológicos

Son numerosos los estudios realizados con el fin de conocer los agentes causantes de NAC y la homogeneidad de sus resultados dependen, en gran parte, de la población seleccionada, de las técnicas microbiológicas empleadas, de los criterios diagnósticos utilizados y del ámbito geográfico donde se desarrolle el estudio.

Un análisis no pormenorizado de los resultados de diversos estudios realizados en los últimos años (búsqueda con base de datos tipo MEDLINE que contiene citas de las revistas científico-médicas incluidas en el Index Medicus. Palabras clave: pneumonia/community-acquired/etiology. Restricción de búsqueda: artículos originales en lengua inglesa publicados durante los años 1990-1994) (Tabla 1-2), nos permite realizar las siguientes afirmaciones:

La mayor parte de los estudios coinciden en afirmar que el S. pneumoniae es protagonista indiscutible de la NAC con porcentajes que varían entre el 5% y el 46% sobre el total de casos diagnosticados. Tan amplias diferencias son consecuencia de utilizar o no el cultivo de esputo como criterio diagnóstico (Antela et al, 1993). En menor proporción participan H. influenzae, L. pneumophila, S. aureus, bacilos gramnegativos, virus y agentes pertenecientes a los géneros mycoplasma, chlamydia y coxiella.



Serie	nº pacientes	Microorganismos			% sin diagnóstico	Comentario
		Primero	Segundo	Tercero		
Ostergaard (1993)	254	neumococo (13.7%)	H. influenzae (6.2%)	Mycoplasma (3.9%)	65.8%	utilización de punción transtraqueal
Fang (1990)	359 (EPOC: 31%)	neumococo (15.3%)	H.influenzae (10.9%)	Legionella (6.7%)	49%	
Pachón (1990)	67 (E. base 46%)	neumococo (37.5%)	gram - (25%)	Legionella (21.8%)	52.2%	selección: neumonía grave
Bates (1992)	154	Legionella (8.4%)	Chlamydia (5.1%)	neumococo (5.1%)	49%	
Almirall (1993)	105 (EPOC: 17%)	Chlamydia (15.2%)	neumococo (12.3%)	Mycoplasma (7.6%)	51.5%	
Moine (1994)	132 (E. base 92%)	neumococo (45%)	gram - (15%)	H. influenzae (15%)	28%	ingresados UCI. Utilización de broncoscopia
Örtquist (1990)	277	neumococo (46%)	Mycoplasma (10%)	virus (5%)	32%	25% infección mixta

Tabla 1-2. Estudios epidemiológicos prospectivos sobre NAC.

La importancia del neumococo como agente responsable de la NAC queda fuera de toda duda, con independencia de la selección de enfermos o de las técnicas diagnósticas empleadas (Moine et al, 1994). En cambio, el protagonismo de H. influenzae se encuentra en estrecha relación con el criterio de selección de población. Así, en estudios donde el grupo de enfermos con EPOC de base representa un porcentaje alto (Fang et al, 1990), H. influenzae aparece como uno de los agentes principales, mientras que en estudios con escasa representatividad de enfermos con EPOC (Almirall et al, 1993), dicho germen no aparece como agente principal. Los gérmenes gramnegativos deben ser tenidos en cuenta en enfermos con enfermedad subyacente grave (Pachón et al, 1990). La existencia de infecciones mixtas no es infrecuente, alcanzando en algunas series, el 25% del total de casos (Örtqvist et al, 1990).

Las tendencias demográficas actuales, han incrementado el interés de los clínicos por la microbiología de la NAC en el anciano. Tanto Venkatesan y colaboradores (1980), como Llorente y colaboradores (1993) utilizando la punción transtorácica como técnica diagnóstica, hallaron a S. pneumoniae y H. influenzae protagonistas de la neumonía en el anciano. Estudios realizados con anterioridad y que concedían cierto protagonismo a los bacilos gramnegativos (Verghese y Berck, 1983), podrían haber considerado microorganismos colonizantes como verdaderos patógenos (Venkatesan et al, 1990).

Por último, cabe resaltar el elevado porcentaje de NAC sin diagnóstico etiológico que, en la mayoría de las series gira en torno al 50% de los casos.

2.2. Microbiología de la NAC

Son numerosos los microorganismos que son capaces de causar NAC, y no es nuestro objetivo una exhaustiva enumeración de cada uno de ellos sino, al contrario, realizar una somera puesta al día de los microorganismos que con más frecuencia se relacionan con la NAC.

2.2.1. Streptococcus pneumoniae

Desde el descubrimiento del neumococo en 1881, este microorganismo se ha asociado con la infección del tracto respiratorio. La neumonía neumocócica se produce como resultado de la microaspiración de los microorganismos que han colonizado la nasofaringe, siendo posible en epidemias en comunidades cerradas la inhalación de bacterias suspendidas en el aire tras la evaporación de gotículas de secreción (Musher, 1991). Los anticuerpos frente al polisacárido capsular del neumococo son considerados generalmente como el mecanismo inmunológico principal de resistencia a la infección. No obstante, la escasa prevalencia de anticuerpos IgG frente al neumococo (15% en establecimientos militares y 33% en varones adultos) contrasta con el hecho de que la neumonía neumocócica no aparezca con mayor frecuencia. El motivo puede ser que la colonización nasofaríngea por neumococo se sigue de la aparición de anticuerpos frente al polisacárido capsular, probablemente en una o dos semanas en la mayoría de las personas. Los individuos que no tienen factores predisponentes desarrollarían inmunidad antes de que pueda aparecer neumonía; en cambio, las personas que tienen alguna alteración de los mecanismos de defensa respiratorios, como los portadores de enfermedades crónicas o los afectados de enfermedades víricas como la gripe, tienen mayor probabilidad de desarrollar neumonía antes de la respuesta de anticuerpos (Musher et al, 1993).

Recientes avances en el estudio de la patogenicidad del neumococo apoyan la utilización de inhibidores de la respuesta inmune como coadyuvantes de la terapia antibiótica (Tuomanen et al, 1995). Estudios de laboratorio sobre animales infectados por cepas de neumococo que

mueren pero no sufren lisis celular -con la consiguiente reducción de la respuesta inflamatoria por parte del huésped-, demuestran la escasa aparición de síntomas y la existencia de menor daño tisular (Tuonamen et al, 1988). Estos avances supondrían la fundamentación teórica de algo ya conocido en la práctica: la administración de corticoides junto con penicilina suprime los síntomas y signos de pacientes con neumonía neumocócica (Wagner et al, 1956).

Determinadas enfermedades subyacentes crónicas condicionan un alto riesgo de infección neumocócica. Así, la infección por VIH, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, el etilismo crónico, neoplasias y diabetes mellitus constituyen las enfermedades crónicas que se asocian con mayor frecuencia a neumonía neumocócica (Gaztelorrutia, 1994). También los ancianos son más susceptibles de infectarse por S. pneumoniae (Espósito, 1984).

Aunque el neumococo se asocia tradicionalmente con la NAC, no le podemos negar cierto papel protagonista en las neumonías nosocomiales que, según las series, oscilan entre el 10% y el 25% de los casos diagnosticados (Tabla 1-3).

Autor	Casos totales	Casos con diagnóstico	Organismo más frecuente	Neumococo
Celisi (1988)	120	48	Pseudomona (39%)	10%
Fagon (1989)	52	52	Pseudomona (31%)	6%
Rello (1991)	67	47	S. aureus (32%)	6%
Potgieter(1992)	31	16	S. aureus (33%)	25%
Sirvent (1994)	20	20	S. aureus (30%)	15%

Tabla 1-3. Protagonismo de Sreptococcus pneurnoniae como agente etiológico de la neumonía nosocomial.

La reciente expansión del infección por VIH ha llevado consigo un renovado protagonismo del neumococo: este microorganismo constituye el agente etiológico más frecuente de las neumonías bacterianas que ocurren en los infectados por el VIH, con una frecuencia de hasta el 50% de las neumonías con agente etiológico demostrado (Teira et al, 1992), con una tasa de ataque seis veces superior a la de la población general (Polsky et al, 1986). La causa de este aumento de la enfermedad neumocócica entre los infectados por el VIH parece estar en una respuesta deprimida de los anticuerpos específicos y en una alteración de la inmunidad de la mucosa respiratoria (Janoff et al, 1992).

Los pacientes con neumonía e infección por VIH tienen síntomas y signos clínicos similares a los de la población general. Sin embargo, no es excepcional encontrar infiltrados intersticiales en la radiología, haciéndose necesario realizar el diagnóstico diferencial con patógenos oportunistas que también causan neumonía en estos pacientes (Roca et al, 1991).

La neumonía neumocócica puede ser bacteriémica hasta en el 37% de los casos (Gransden et al 1985). La frecuencia de bacteriemia varía en relación con el serotipo, siendo del 62% en un brote de neumonía por S. pneumoniae serotipo 1 (Mercat et al, 1991). También resulta significativamente más frecuente entre aquellos con enfermedad subyacente

(66%) que entre los que no la presentan (Gudiol, 1977). Entre los infectados por el VIH la bacteriemia puede ocurrir hasta en el 76% de los casos (Janoff et al, 1992). La neumonía neumocócica bacteriémica está agravada con una mortalidad que en algunas series alcanza el 45% de los casos (Austrian, 1986). Diversas características clínicas de la población estudiada se asocian con una mayor mortalidad, como la presencia de empiema inicial, la afectación multilobar, el shock séptico y la inmunodeficiencia previa (Gransden, 1985). La presencia de coinfección por el VIH parece agravar el pronóstico de la infección neumocócica. En un estudio llevado a cabo por Pesola y Charles (1992), la mortalidad de la neumonía neumocócica entre los infectados y no infectados por el VIH fue de 57% y 25% respectivamente. Recientemente, Marfin y colaboradores (1995) han analizado la existencia de factores de riesgo en 102 pacientes con neumonía neumocócica bacteriémica: una edad superior a 48 años, la existencia de enfermedad pulmonar previa, la adquisición nosocomial de la infección, así como una temperatura inferior a 38°C, sirvieron para predecir fallo respiratorio o muerte en el 67% de los casos.

2.2.2. *Mycoplasma pneumoniae*

Mycoplasma pneumoniae constituye una causa frecuente de infección del tracto respiratorio inferior entre la población joven. Se manifiesta como brotes epidémicos cada 4 años en forma de faringitis o traqueobronquitis (Manresa y Dorca, 1994). Otras características epidemiológicas quedan expuestas en la tabla 5. Un 10% de los pacientes afectados desarrollarán neumonía. Aunque su protagonismo entre la población mayor de 65 años se considera escasa, son pocos los estudios realizados a este respecto. Recientemente, Marrie (1993) entre 1.300 casos de NAC, encontró 64 casos de infección por *Mycoplasma pneumoniae*, de los cuales 6 (9.4%) correspondían a individuos mayores de 65 años. Sus manifestaciones clínicas y radiológicas no se diferenciaron de las causadas por otros microorganismos en este grupo de edad y la evolución fue favorable en todos los casos. A este respecto conviene recordar que, aunque la mayoría de las neumonías causadas por *Mycoplasma pneumoniae* son bien toleradas por el paciente, casos descritos de insuficiencia respiratoria asociada y evolución fatal ya han sido descritos con anterioridad (Jastremsky, 1979).

Ambito de adquisición	comunidad (escuelas, bases militares)
Epidemias	cada 4 años
Predominio estacional	no
Periodo de incubación	3 semanas
Edad de máxima incidencia	4-20 años
Prioridad de sexo	no (1/1 attack ratio)

Tabla 1-4 Características epidemiológicas de la infección por *Mycoplasma pneumoniae*.
Modificado de Wallace (1993).

2.2.3. *Chlamydia pneumoniae*

Hace casi diez años, Grayston y colaboradores (1986) aislaron lo que denominaron una nueva cepa de *Chlamydia psittaci* de la faringe de ocho estudiantes de la Universidad de

Washington, que tenían una infección aguda del tracto respiratorio. Chlamydia pneumoniae es el nombre que finalmente se ha adoptado (Grayston, 1989) para el microorganismo hasta hace poco conocido como Chlamydia psitacci variedad TWAR, una bacteria que, al igual que las otras dos especies del género, es gramnegativa, inmóvil, no crece en medios de cultivo ordinarios y requiere células vivas para su multiplicación. La anterior designación de este microorganismo como variedad TWAR, viene de las letras con las que se denominaron los dos primeros aislamientos, en los laboratorios donde fueron reconocidos: TW-183 y AR-39. TW-183 fue aislado en 1965 del ojo de un niño en un estudio de tracoma realizado en Taiwan y AR-39 fue aislado en 1986 de la faringe de un estudiante con faringitis de la Universidad de Washington, Seattle.

A diferencia de C. psitacci que es una zoonosis cuyo reservorio principal son los pájaros y animales domésticos, C. pneumoniae no tiene reservorio animal, siendo su único huésped natural el hombre.

En un principio se pensó que C. pneumoniae era otra cepa de C. psitacci, pero estudios posteriores (Marrie, 1993) demostraron que se trataba de una nueva especie (Tabla 1-5).

Se han descrito infecciones endémicas y epidémicas causadas por C. pneumoniae en diferentes localizaciones. Especialmente sobresalientes son los trabajos publicados que refieren datos de esta infección en Norteamérica y en los países nórdicos de Europa. En cuanto a las zonas endémicas podemos destacar: infección por TWAR en Seattle 1963-1976 (Grayston et al 1989); infección por C. pneumoniae en el Victoria General Hospital en Halifax, Nueva Escocia, entre 1981 y 1984 (Marrie et al, 1987), y enfermedad del tracto respiratorio en estudiantes de la Universidad de Washington en 1983-1987 (Grayston, 1986). En relación a las epidemias, éstas se han producido en Dinamarca, Noruega y Suecia en 1981-1983. Estudios de infección en Dinamarca sugieren que hubo una epidemia a principios de los años ochenta. En Noruega, en 1981, hubo un gran aumento de casos de ornitosis y lo mismo ocurrió en Suecia durante 1981-1982 (Grayston et al, 1989), y epidemias de neumonía por TWAR en cuarteles militares en Finlandia (Kleemola, 1988). También en Finlandia ha habido otras epidemias entre la población civil, jóvenes estudiantes en su mayoría (Saikku et al, 1985).

	<u>C. tracomatis</u>	<u>C. psitacci</u>	<u>C. pneumoniae</u>
Homología de DNA con <u>C. pneumoniae</u>	<5%	< 10%	94%-100%
Sensibilidad a la sulfonamida	si	no	no
Portador de antígeno de especie específico en membrana exterior	si	si	no
Número de cepas	18	desconocido	al menos 2
Existencia de plásmidos	si	si	no
Biosíntesis de folato	si	no	no
Glicógeno en inclusión	si	no	no

Tabla 1-5 Similitud entre las tres especies de Chlamydia.

Estudios de prevalencia basados en la detección de anticuerpos específicos frente a C.

pneumoniae en población general, sugieren que esta infección está ampliamente distribuida. Se han encontrado IgG específicas en, aproximadamente, el 50% de los adultos investigados según estudios realizados en siete ciudades, variando desde un 49% en Canadá a más de un 60% en Taiwán y Panamá (Grayston, 1990). Se ha encontrado que la prevalencia de anticuerpos frente a C. pneumoniae en adultos es de 5 a 10 veces mayor que para C. tracomatis (Wang, 1986), y la prevalencia es de un 10-25% mayor en varones que en mujeres. Afecta a personas de todas las edades aunque parece menos frecuente en niños menores de 5 años (Marrie, 1990).

Se ha encontrado evidencia de infección por C. pneumoniae en, aproximadamente, el 10% de los adultos con neumonía (Tabla 1-6). Otras infecciones menos frecuentes interesan el tracto respiratorio en forma de faringitis, bronquitis y sinusitis (Pérez Trallero y Montes, 1991). Especialmente provocadores son los trabajos que relacionan la C. pneumoniae con la cardiopatía isquémica (Saikku et al, 1988) y la sarcoidosis (Gronhager, 1988).

Series	Lugar	Pacientes	C. pneumoniae	Diagnóstico
Fang 1990	Estados Unidos	359	22(6%)	serología
Campbell, 1991	Estados Unidos	49	3(6%)	cultivo serología
Blasi 1993	Italia	142*	6(40%)	serología
Grayston, 1993	Estados Unidos	54**	12(22%)	serología cultivo PCR

Tabla 1-6 Neumonía adquirida en la comunidad causada por C. pneumoniae.

*Exacerbaciones en pacientes con EPOC.

**Infección aguda M tracto respiratorio.

Hasta el momento, son escasos los trabajos realizados en nuestro país con el fin de conocer el protagonismo de la C. pneumoniae como agente etiológico de la NAC. Así, un estudio retrospectivo sobre 103 pacientes con NAC (Guerrero et al, 1991), se demostró la existencia de contacto previo con el microorganismo e infección previa en el 57.3% y 4% de los casos, respectivamente. En un análisis de prevalencia realizado entre niños y jóvenes del País Vasco (Montes et al, 1992), se hallaron datos de infección por C. pneumoniae en más del 40% de los mayores de siete años. Por otro lado, dos estudios prospectivos, uno en el área de Barcelona (Almirall et al, 1993) y el otro en Madrid (Antela et al, 1993) atribuyen a la C. pneumoniae el 15.2% y el 4.9% de los casos de NAC, respectivamente.

Recientes publicaciones, sin embargo, sugieren que la relación entre C. pneumoniae e infección no está completamente aclarado. Gnarpe y colaboradores (1991) aislaron C. pneumoniae en el esputo del 5% (11 de 234) de los adultos sanos, lo que traduciría una situación de portadores crónicos asintomáticos. Por otro lado, Chirgwin y colaboradores (1991) encontraron evidencia de infección mixta en, al menos, 2 de los 16 casos con cultivo positivo para C. pneumoniae. La evidencia de infección por otro germen (uno con hemocultivo positivo a H. influenzae y otro con la tinción de gram positiva para neumococo), junto con la buena respuesta observada tras la aplicación de β -lactámicos -fármacos considerados ineficaces frente a C. pneumoniae-, sugeriría, en el mejor de los casos, un

escaso papel patógeno de C. pneumoniae en el desarrollo de estas infecciones.

2.2.4. Legionella pneumophila

Un brote epidémico de neumonía entre los participantes en una convención de la Legión Americana en un hotel de Filadelfia en 1976 dio lugar al reconocimiento e identificación de la Legionella pneumophila como agente causante de NAC (Fraser et al, 1977). La elevada mortalidad atribuida a este germen -29 de los 182 pacientes afectados durante aquel brote fallecieron-, ha contribuido a una exhaustiva investigación durante los últimos años con el fin de conocer con detalle aspectos epidemiológicos, clínicos y terapéuticos relacionados con este microorganismo. Así, la asociación entre los brotes epidémicos de neumonía por Legionella pneumophila con la cercanía a las torres de refrigeración de aire acondicionado ha sido recientemente reevaluada. Stout y colaboradores (1992) encuentran que el 40% de las NAC producidas por este microorganismo pueden asociarse, mediante estudio molecular, a los sistemas de distribución de agua potable de la residencia o lugar de trabajo del individuo afectado. Por otro lado, los resultados de un estudio prospectivo realizado en nuestro país durante 7 años con más de 4.500 casos (Tellez et al, 1990), confirman la aptitud geográfica de la L. pneumophila por la cuenca mediterránea.

La presentación clínica de la neumonía por L. pneumophila resulta extremadamente variable no lográndola incluir entre los patrones clínicos clásicos de neumonía típica o atípica. La experiencia de algunos autores (Pennington, 1994), atribuyen a la neumonía por L. pneumophila una forma de presentación bifásica: Durante los primeros días de enfermedad, los síntomas generales como malestar, cefalea y mialgias protagonizan el cuadro clínico, para dar paso en una segunda fase, a un cuadro clínico superponible al originado por el S. pneumoniae: fiebre elevada con escalofríos, tos purulenta, dolor torácico de carácter pleurítico y leucocitosis. La presencia de diarrea no resulta suficientemente específica como para descartar otros patógenos (Girod et al, 1982). Un infiltrado alveolar, bien sea parcheado, segmentario o lobar, caracteriza la presentación radiológica de la enfermedad.

En la actualidad disponemos de diversos métodos para detectar la presencia de L. pneumophila como agente causal de NAC (Tabla 1-7) y la elección de uno u otro queda subordinada a las estrategias económicas de cada laboratorio de microbiología.

Test	Sensibilidad	Especificidad	Comentario
	(%)	(%)	
Serología	75	95-99	sensibilidad óptima a las 6-9 semanas
Detección de Antígeno	25-75	95-99	
(inmunofluorescencia)			no se negativiza en presencia de antibiótico
cultivo			medio de cultivo selectivo BCYE α
- esputo	25-75	100	
- sangre	10-30	100	
Sondas de DNA	50-70	95-99	no se negativiza en presencia de antibiótico
Antígeno en orina	80-99	99	no se negativiza en presencia de antibiótico

Tabla 1-7 Diagnóstico de laboratorio de la infección por Legionella pneumophila (modificado de Edelstein y Meyer, 1994).

La alta eficacia del tratamiento de la legionelosis con eritromicina ha sido validada por numerosos estudios clínicos en los últimos 15 años (Domingo et al, 1991). Esta sólida evidencia clínica en favor de la eritromicina como tratamiento de elección en la legionelosis tiene que ser valorada a la luz del hallazgo de nuevos antimicrobianos con una superior actividad in vitro y diversas ventajas farmacocinéticas. En atención a las peculiares características patogénicas de Legionella el tratamiento óptimo debería combinar la mejor actividad intrínseca frente al microorganismo y una buena capacidad para penetrar en el interior de las células fagocitarias. Algunos fármacos que muestran una buena potencia in vitro no son capaces de alcanzar una buena concentración intracelular. Por este motivo, se explica la baja eficacia clínica de antibióticos que son altamente eficaces in vitro como amoxicilina-clavulánico o imipenem. Josamicina y la mayoría de los denominados nuevos macrólidos, como claritromicina, azitromicina, midecamicina, rokitamicina y roxitromicina, muestran una mejor actividad in vitro frente a legionella que eritromicina (Jones et al, 1992). Los primeros estudios clínicos publicados (Hamedani, 1991) sobre un total de 87 casos de legionelosis, muestran una eficacia clínica superior al 95% después de la administración oral de claritromicina a dosis de 500 mg cada 12 horas por vía oral. En base a la experiencia clínica previa, parece prudente mantener el tratamiento hasta completar tres semanas en los siguientes casos: huésped inmunocomprometido, existencia de enfermedad de base y casos de legionelosis clínicamente grave, dado que tratamientos más cortos en dichas circunstancias se han asociado a recrudescencia de la enfermedad (Roig et al, 1991).

2.2.5. Haemophilus influenzae

Aunque la primera descripción de Haemophilus influenzae se remonta a 1893, su relación con la NAC fue escasa hasta los años setenta (Levin et al, 1977). A partir de entonces, aumentó considerablemente el número de casos informados. Se ha sugerido que este aumento en la incidencia podría deberse a una disminución del estado de inmunidad aparecida durante los últimos años. Así, se ha propuesto que el tratamiento antimicrobiano precoz de las infecciones infantiles sería la causa de la reducción de anticuerpos protectores (Pierce, 1991).

Tanto las características clínicas, analíticas y radiológicas resultan ineficaces para diferenciar entre la neumonía causada por Haemophilus influenzae y la causada por Streptococcus pneumoniae, si no es por la mayor predisposición del primero a originar derrame pleural (Pierce, 1991). Recientemente (Kirtland et al, 1994), se ha relacionado a Haemophilus influenzae con la neumonía crónica, arbitrariamente definida como aquella infección respiratoria que genera síntomas respiratorios y anomalías radiológicas de más de un mes de duración (Kirtland y Winterbauer, 1991).

Existen seis cepas encapsuladas y, por lo tanto, tipificables de Haemophilus influenzae. Hasta hace poco se pensaba que la mayoría de las neumonías del adulto se debían a la cepa tipo b, la responsable con mayor frecuencia de las infecciones infantiles. Sin embargo, recientemente se ha descubierto que en el adulto la enfermedad puede estar causada por cepas no encapsuladas y, en consecuencia, no tipificables. Este hecho podría influir en la elección del tratamiento puesto que, a diferencia de las cepas tipo b, la mayoría de las cepas no encapsuladas resultan sensibles a la ampicilina (Pierce, 1991).

2.2.6. Klebsiella pneumoniae

El papel de la Klebsiella pneumoniae como agente común causante de NAC ha sido puesto en tela de juicio recientemente (Carpenter, 1990). Numerosos estudios realizados antes de 1960 asociaban este microorganismo con NAC en alcohólicos, y se caracterizaba por la producción de un esputo gelatinoso e imágenes radiológicas con abombamiento de cisuras. Tales casos resultan enormemente infrecuentes en la actualidad y la creencia de que dichos casos fueran protagonizados por anaerobios de la orofaringe está cada vez más extendida (Norvick et al, 1991).

2.2.7. Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus es una causa poco común de neumonía fuera del hospital, salvo en circunstancias muy concretas. Es bien conocida la predisposición de los pacientes con gripe a la sobreinfección por este microorganismo. Las neumonías por S. aureus más frecuentemente diagnosticadas en pacientes ambulatorios suelen ocurrir en enfermos adictos a drogas por vía parenteral con bacteriemias y endocarditis causadas por S. aureus que secundariamente siembran el pulmón.

2.2.8. Coxiella Burnetti

La neumonía causada por Coxiella burnetti se ha denominado clásicamente "Fiebre Q". Descrita por primera vez en Australia (Derrick, 1937), donde un microorganismo desconocido hasta entonces -"Q": query (interrogación)- fue aislado en la sangre y orina de 9 trabajadores de un matadero. Como zoonosis ampliamente distribuida, la NAC causada por C. burnetti constituye una curiosidad médica en el ámbito urbano. En nuestro país, el país vasco aparece como una zona donde la fiebre Q constituye una entidad frecuente, contribuyendo en un 18% a los agentes etiológicos de NAC (Sobradillo et al, 1989). Esto, unido al hallazgo de evidencia serológica de infección pasada en el 28% de los granjeros del norte de Irlanda (Standford et al, 1990), con un incremento estacional entre Abril y Junio, apoya la asociación de la neumonía por C. burnetti con prácticas ganaderas y, en concreto, con el pastoreo de ovejas.

Un reciente trabajo de Sobradillo y colaboradores (1992) ha contribuido a despejar ciertas dudas en referencia al tratamiento de la infección por C. burnetti. El trabajo fue diseñado con el fin de conocer la evolución clínica de 48 pacientes con infección por C. burnetti serológicamente confirmada. Se randomizaron dos grupos para recibir tratamiento con doxiciclina y eritromicina. Aunque la fiebre desapareció estadísticamente más pronto en el grupo tratado con doxiciclina, no se observaron diferencias al comparar otros parámetros evolutivos.

2.2.9. Virus

Los virus responsables de la gripe, algunas enfermedades exantemáticas y el virus respiratorio sincitial, pueden ser responsables de algunos casos de NAC en la edad adulta. Su diagnóstico tiene interés por razones epidemiológicas, por existir para ellos algunas ofertas terapéuticas y por la asociación que algunos de estos agentes guardan con la predisposición a ciertas sobreinfecciones bacterianas. Recientemente, Cartwright (1991) y Reilly (1991) han demostrado un marcado aumento de la infección meningocócica varias semanas después de un brote de gripe A. Por otro lado, aunque la neumonía causada por el virus respiratorio sincitial no suele ser grave, algunos casos de neumonitis grave ya se han descrito. En estos casos, la ribavirina en forma de aerosol podría ser efectiva (Aylward et al, 1991).

3. Pronóstico de la NAC

El pronóstico de la NAC varía ampliamente, desde la recuperación completa con tratamiento domiciliario, hasta la muerte, a pesar del ingreso del paciente en unidades de cuidados intensivos. Se han propuesto varios índices pronósticos que han sido validados prospectivamente. Sin embargo, desde el punto de vista práctico interesa conocer a priori qué grupo de pacientes puede ser tratado de forma segura en régimen ambulatorio.

Diversas comisiones de control de calidad han sugerido un conjunto de criterios para calificar como "apropiado" el ingreso de los pacientes con neumonía (Tabla 1-8).

1. Signos vitales de enfermedad definidos por:
 - pulso > 140/min.
 - presión arterial sistólica < 90 mmHg o
 - frecuencia respiratoria > 30/min.
2. Trastorno del nivel de conciencia, definido como reciente aparición de desorientación temporoespacial, estupor o coma.
3. Hipoxemia arterial $pO_2 < 60$ mmHg en gasometría basal con aire ambiente
4. Infección supurada asociada a la neumonía (ej: empiema, artritis, meningitis, endocarditis)
5. Grave trastorno electrolítico, hematológico o metabólico recientemente descubierto:
 - Na < 130 mEq/l
 - Hct < 30 %
 - Neutrófilos < 1000/mm³
 - Creatinina > 2.5 mg/dl
6. Enfermedad médica coexistente que requiera ingreso independiente de la neumonía (ej: sospecha de infarto agudo de miocardio)

Tabla 1-8 Definición de las indicaciones de ingreso hospitalario según las comisiones de control de calidad de EEUU (Medisgroups database).

Sin embargo, los protocolos de actuación deben ser considerados como orientativos para el clínico, y nunca sustituir su juicio que individualiza cada caso; de lo contrario, la decisión tomada puede no ser beneficiosa para el paciente. Así, Fine y colaboradores (1993) encontraron que un 37% de los pacientes que fueron clasificados como susceptibles de tratamiento ambulatorio sufrieron una evolución complicada. El término evolución complicada fue definido como: muerte en las siguientes 6 semanas, desarrollo de una complicación médica, fiebre persistente, necesidad de fluidoterapia intravenosa, oxigenoterapia durante más de 3 días u hospitalización tras iniciar tratamiento ambulatorio. Fine y colaboradores (1993), describieron 5 factores adicionales predictores de evolución complicada en el grupo de pacientes susceptibles de tratamiento ambulatorio. Los factores hallados fueron: edad mayor de 65 años, presencia de enfermedad de base (comorbilidad), temperatura superior a 38.3 °C, inmunosupresión o neumonía de alto riesgo (causada por estafilococos, bacilos gramnegativos, aspiración o postobstrucción). La probabilidad de evolución complicada se incrementó de forma lineal desde un 12% hasta un 100% dependiendo del número de factores existentes.

Dos amplios estudios (British Thoracic Society, 1987 y Farr, 1991), han demostrado que las 3 variables que predicen de forma independiente la mortalidad de la NAC en el adulto

son: concentración de nitrógeno uréico superior a 20 mg/dl, presión arterial diastólica igual o inferior a 60 mmHg y frecuencia respiratoria superior a 30 por minuto. La combinación de 2 de estas variables implica un riesgo de muerte 21 veces superior al grupo de referencia (sensibilidad: 88%; especificidad: 79%). Brancati y colaboradores (1993), han demostrado que, junto a la frecuencia respiratoria y la concentración de nitrógeno uréico, la enfermedad de base del paciente fue el factor predictivo más importante de mortalidad tanto hospitalaria como en los 2 años siguientes (Tabla 1-9).

Variable	Farr BM (n= 245 pacientes) RR (IC 95)	Brancati FL (n= 141 pacientes) RR (IC95)
Nitrógeno uréico > 20 mg/dl	8.93 (2.66-30.00)	4.02 (1.75-9.17)
Presión arterial diastólica < 60 mmHg	3.67 (1.23-10.90)	
Frecuencia respiratoria > 30/min	3.16 (1.07-9.31)	2.86 (1.37-5.95)
Comorbilidad		2.58 (1.17-5.67)

Tabla 1-9 Factores relacionados con la mortalidad en la NAC. RR: riesgo relativo. IC95: intervalo de confianza al 95%.

4. Tratamiento de la NAC

Para pacientes que no reúnen criterios de ingreso hospitalario es recomendable, por su comodidad, utilizar tratamientos por vía oral. La eritromicina, por su actividad frente a S. pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia spp y Legionella spp, ha sido considerada durante un largo tiempo el antimicrobiano de elección en tratamientos empíricos de NAC. Sin embargo, su principal inconveniente es la elevada proporción de efectos adversos gastrointestinales. Dichos efectos fueron tan intensos que obligaron a suspender el tratamiento en 16.7%, 10.8% y 8% de los pacientes que recibieron tabletas entéricas, estearato y etilsuccinato, respectivamente (Carter et al, 1987). Otros inconvenientes asociados con el tratamiento con eritromicina se refieren a los derivados de su espectro y farmacocinética: su reducida actividad frente a Haemophilus influenzae y la dificultad para seguir un régimen de tratamiento oral cada 6 horas. Los nuevos macrólidos (roxitromicina, claritromicina, diritromicina, azitromicina) presentan mejoras en cuanto a farmacocinética y tolerancia gastrointestinal respecto a su predecesor. Roxitromicina y claritromicina permiten la administración cada 12 horas con una menor frecuencia de efectos secundarios (Bahal y Nahata, 1992). Claritromicina ha demostrado una mejor tolerancia gastrointestinal que roxitromicina (Chien et al, 1993). Azitromicina muestra, además, actividad in vitro frente a Haemophilus influenzae y por su larga vida media puede ser administrada en una dosis diaria. Un estudio aleatorizado (Schonwald et al, 1991), sugiere que una dosis total de 1.5 gr de

azitromicina resulta igual de efectiva administrado tanto en regímenes de 3 como de 5 días, en el tratamiento de la neumonía atípica.

Los antibióticos betalactámicos han sido ampliamente utilizados en el tratamiento de la NAC. Tanto cefaclor como amoxicilina- ac. clavulánico han demostrado en algunos ensayos clínicos tener una eficacia clínica similar a la de los macrólidos (Tilyard y Dovey, 1992). Para algunos autores, los betalactámicos serían los antimicrobianos de elección en los casos de sospecha clínica de neumonía neumocócica.

El inconveniente de los ensayos clínicos que comparan betalactámicos frente a macrólidos en el tratamiento de la NAC es su falta de poder estadístico (inferior al 50%) para permitir detectar diferencias significativas entre ambos grupos de antimicrobianos. Un estudio suficientemente amplio es probable que favoreciera la utilización de macrólidos, ya que resultan activos frente, al menos, el 80% de las cepas de S. pneumoniae y, en teoría, frente al 100% de las bacterias causantes de neumonía atípica (Ena, 1995).

Se han comunicado diversos estudios de tratamiento de NAC con quinolonas; sin embargo, la actividad de ciprofloxacino frente a estreptococos y Mycoplasma spp varía de pobre a moderada (Frieden y Mangi, 1990). En la práctica clínica se ha observado mala evolución de los pacientes en tratamiento con 750 mg de ciprofloxacino cada 12 horas cuando el microorganismo implicado en la neumonía era S. pneumoniae (Mouton et al, 1991). Queda aún por conocer el papel que tendrán las nuevas quinolonas, de mayor actividad frente a microorganismos grampositivos, en el tratamiento empírico de la NAC.

La selección del antimicrobiano para los pacientes que deben ingresar en el hospital depende esencialmente de dos factores: proporción de resistencia de S. pneumoniae a penicilinas y gravedad del paciente en el momento del ingreso.

El interés en el tratamiento de la neumonía neumocócica viene motivado por la creciente proporción de neumococos con sensibilidad disminuida a la penicilina. Las dos primeras cepas de neumococos con resistencia a la penicilina fueron referidas hace ya treinta años (Kislak et al, 1965), describiéndose el primer caso clínico en un paciente pocos años después (Hansman y Bullen, 1967). Desde entonces, el fenómeno de resistencia a la penicilina se ha extendido universalmente, afectando también a nuestro país, con unos porcentajes de resistencia intermedia a la penicilina que han aumentado desde un 4.3%-6% en 1979 a 18%-26.6% en 1992, evolucionando las cepas altamente resistentes desde el 0% al 8.3%-14.9% en las mismas fechas. Para la eritromicina, el neumococo también muestra niveles elevados de resistencia, los cuales oscilan en nuestro país entre el 12%-19% en los últimos años (Bouza, 1993). Los neumococos en nuestro país presentan diversos niveles de resistencia a otros antimicrobianos: son uniformemente sensibles a vancomicina y comienzan a aparecer cepas aisladas con resistencia a cefotaxima, ceftriaxona y cefuroxima (Liñares et al, 1993). Por todo esto, mientras la penicilina permanece como antibiótico de elección frente al neumococo sensible, es motivo de discusión en la actualidad el antibiótico de elección cuando el neumococo responsable presenta una resistencia intermedia a la penicilina. En estos casos, se ha sugerido que las neumonías neumocócicas causadas por cepas con concentración mínima inhibitoria (CMI) no superior a 2 $\mu\text{g/ml}$, pueden ser tratadas con penicilina intravenosa en dosis entre 150.000 y 250.000 UI por kg de peso y día (Pallarés et al, 1987). La neumonía causada por cepas con CMI de penicilina superior a 2 $\mu\text{g/ml}$ debe ser tratada con antimicrobianos alternativos. En estos casos, la elección podría recaer en la eritromicina, aunque la elevada proporción de resistencia a este fármaco probablemente obligará a escoger entre antibióticos β -lactámicos más activos frente a neumococo, como cefuroxima, cefotaxima o ceftriaxona (Palomino et al, 1994).

En cualquier caso, la penicilina posee como, tratamiento empírico, un espectro muy

limitado. En nuestro país, parece aconsejable la utilización de cefalosporinas de 3ª generación para el tratamiento empírico inicial de la NAC que requieren hospitalización. Ceftriaxona y cefotaxima poseen una actividad sobresaliente frente a S. pneumoniae, S. aureus, H. influenzae y enterobacterias. El intervalo de CMI para cefotaxima y ceftriaxona en los neumococos con alta resistencia a penicilina varía de 0.5 a 2 µg/ml (Liñares et al, 1992). La administración de 1g de cefotaxima consigue un pico sérico de 42 µg/ml y la de 1g de ceftriaxona, de 169 µg/ml, lo que supone de 20 a 80 veces la CMI de los neumococos más resistentes (Scully et al, 1984).

En pacientes con NAC e insuficiencia respiratoria grave, hay que tener en cuenta que S. pneumoniae y Legionella pneumophila constituyen los patógenos más frecuentes, con el 59% de los casos (Rello et al, 1993). El tratamiento de elección estaría constituido por la asociación de una cefalosporina de 3ª generación más eritromicina (Torres et al, 1991).

5. Técnicas diagnósticas en la NAC

5.1 Técnicas de diagnóstico clínico

Los criterios clínicos que clasifican la neumonía en típica (comienzo brusco, dolor pleurítico, tos productiva purulenta y semiología de condensación) -con el S. pneumoniae como agente protagonista- y atípica -con el M. pneumoniae como agente protagonista-, han sido ampliamente utilizados y recientemente reevaluados por diversos autores. Farr y colaboradores (1989) fueron capaces de filiar correctamente tan sólo 42% de los 441 adultos con NAC utilizando variables como la edad, número de días de enfermedad anteriores al ingreso, existencia de esputo hemoptoico, condensación alveolar en la radiografía de tórax y cifra de leucocitos totales en sangre periférica. Por otro lado, Fang y colaboradores (1990) en un estudio multicéntrico sobre 359 casos, realizaron una comparación entre los casos de neumonía atípica (virus, M. pneumoniae, C. pneumoniae) y neumonía típica (S. pneumoniae, H. Influenzae, S. aureus y bacilos gramnegativos). Hallazgos considerados como "atípicos" (aparición gradual de síntomas, ausencia de escalofríos, tos no productiva, bajo grado de fiebre, ausencia de dolor pleurítico o de consolidación radiológica) no ocurrieron con más frecuencia -de manera estadísticamente significativa- en aquellos pacientes con neumonía por virus, M. pneumoniae o C. pneumoniae. Los autores consideran obsoleta esta terminología y sugieren su abandono en la práctica clínica.

5.2. Técnicas de diagnóstico microbiológico

5.2.1. Técnicas relativas a la obtención de muestras

5.2.1.1. Técnicas no invasivas

El cultivo de esputo, los hemocultivos y la serología constituyen los métodos de diagnóstico microbiológico habitualmente utilizados. El valor del cultivo de esputo como criterio de diagnóstico etiológico de neumonía está sujeto a continuo debate. Numerosos gérmenes colonizan la vía aérea superior. Así, es ya conocido que la orofaringe puede estar colonizada por Streptococcus pneumoniae en el 35% de los niños, en el 20% de los adultos sanos y en 40% de los individuos con bronquitis crónica (Hendley et al, 1975). Asimismo, existe la posibilidad de aislar gérmenes gramnegativos -como se muestra en la Tabla 1-10- entre el 8% y el 60% de individuos no sometidos a tratamiento antibiótico previo (Valenti et al, 1978), generando cultivos de esputo con resultados falsamente positivos cuando se trata de conocer el agente etiológico de la NAC.

Población	% gramnegativos
-----------	-----------------

Adultos < 65 años	8
Ancianos independientes	19
Ancianos en residencias	23
Ancianos ingresados en unidades de larga estancia	42
Ancianos ingresados en unidades de agudos	60

Tabla 1-10 Portadores asintomáticos de bacilos gramnegativos en orofaringe de individuos no sometidos a tratamiento antibiótico durante las 4 semanas previas al estudio.

Con el fin de minimizar los efectos contaminantes de la flora orofaríngea sobre las secreciones procedentes del tracto respiratorio inferior, tanto Bartlett (1974) como Murray y Washington (1975) definieron los criterios de pureza del esputo basados en la cuantificación de leucocitos y de células epiteliales de la muestra. Según estos criterios, Mizrachi y Valenstein (1987) encontraron que el 62% de las muestras enviadas al laboratorio para su procesamiento no eran representativas del foco inflamatorio pulmonar. Además, existe la posibilidad de no obtener muestra de esputo para estudio. Así, hasta el 30% de los pacientes pueden ser incapaces de expectorar (British Thoracic Society, 1987).

Por otro lado, los hemocultivos son capaces de aislar el agente causal de NAC en, tan sólo, el 25-30% de los casos (Venkatesan y Macfarlane, 1992), y se requieren varios días para la obtención de los resultados.

Asimismo, diversos microorganismos difíciles de cultivar como *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *L. pneumophila* y algunos virus, pueden ser identificados mediante técnicas serológicas. Estas técnicas, aplicadas a series de adultos con NAC, suelen proporcionar el diagnóstico microbiológico en, aproximadamente, el 25% de los casos (Marrie, 1994). Desafortunadamente, estas técnicas están sujetas a la respuesta inmunitaria del paciente que, en la mayoría de los casos, se retrasa entre una y cinco semanas en aparecer (Pennington, 1994).

En suma, las inherentes dificultades en la interpretación de los hallazgos del cultivo de esputo junto con el retraso en la obtención de resultados definitivos de los hemocultivos y de la serología, no permiten al clínico depositar su confianza en estas técnicas en el momento de elegir una pauta antibiótica eficaz.

5.2.1.2. Técnicas invasivas

5.2.1.2.1. Generalidades

Existe controversia en la actualidad sobre la utilización de técnicas diagnósticas invasivas en el manejo de pacientes con NAC. Por un lado, la falta de sensibilidad del hemocultivo y tanto, el escaso número de ocasiones en que el esputo se encuentra disponible para estudio, como su discutida especificidad, apoyarían el empleo de métodos más sensibles y específicos. En el otro extremo, se sitúan autores como Woodhead y colaboradores (1991); en su estudio sobre 122 casos de NAC, los resultados microbiológicos obtenidos sólo sirvieron para cambiar el 8% de los tratamientos empíricos comenzados, rechazando así la opinión de realizar estudios microbiológicos exhaustivos en el manejo de la NAC. Posturas más eclécticas (Torres, 1994), sugieren el empleo de pautas antibióticas empíricas basadas en estudios epidemiológicos en cada comunidad, donde el empleo de técnicas diagnósticas

invasivas tendrían su cabida con el fin de ampliar la escasa rentabilidad diagnóstica de los métodos microbiológicos convencionales.

Es el caso de Ostergaard y colaboradores (1993), que introdujeron en su estudio la punción transtraqueal (PTT) como técnica diagnóstica, mostrando una sensibilidad no despreciable del 58.8%. Sin embargo, el escaso porcentaje de casos en que la situación del enfermo permitió la realización de la técnica (46.8%), junto con la posibilidad de obtener falsos resultados positivos en pacientes con enfermedad pulmonar previa (se aisló H influenzae en el 78.8% de enfermos EPOC frente al 45.3% de aislamientos en enfermos sin EPOC), no permite depositar nuestra confianza en la PTT como técnica diagnóstica estándar.

La broncoscopia con obtención de muestras del tracto respiratorio inferior, bien por cepillado bronquial (BAS) o lavado broncoalveolar (BAL), ha demostrado su eficacia en el diagnóstico de NAC no filiadas por métodos convencionales. Así, Ortqvist y colaboradores (1990) utilizaron la broncoscopia con BAS en 24 pacientes con NAC; de éstos, trece (54%) fueron diagnosticados etiológicamente por métodos convencionales, mientras que la broncoscopia verificó el diagnóstico en 7, añadió un patógeno en un caso, y reveló la etiología en 6 casos adicionales.

Existe un consenso general en utilizar la broncoscopia en aquellos casos graves, que requieren ingreso en unidades de cuidados intensivos, o situaciones que no responden a terapias empíricas habituales. En este sentido, Sorensen y colaboradores (1989) obtuvieron el diagnóstico por broncoscopia (BAS y BAL) en el 81% de 29 pacientes ingresados en UCI y que habían recibido tratamiento antibiótico previo; los cultivos del material obtenido por broncoscopia, esputo y hemocultivos, fueron positivos en el 48%, 42% y 22% de los casos respectivamente. Torres y colaboradores (1989), por otro lado, analizaron 9 pacientes con insuficiencia respiratoria que habían recibido tratamiento antibiótico previo y obtuvieron un crecimiento cuantitativamente significativo, tanto en BAS como en BAL, tan sólo en 2 pacientes (21%). Feinsilver y colaboradores (1990) sometieron a broncoscopia con BAL a 35 pacientes con NAC no resuelta tras 7 días de terapia antibiótica empírica. Catorce (40%) pacientes fueron diagnosticados de una patología diferente de NAC y la broncoscopia fue diagnóstica en 12 (34.25); ocho casos fueron diagnosticados mediante citología del BAL: 4 carcinomas, 3 Pneumocystis carinii, 1 Citomegalovirus; los cultivos del BAL fueron positivos en 3 casos: 2 tuberculosis y 1 actinomicosis; un paciente fue diagnosticado de neumonía eosinofílica por biopsia transbronquial. De los 21 pacientes restantes, no se obtuvo un diagnóstico específico y se consiguió una resolución radiológica completa con antibióticos, por lo que fueron consideradas como neumonías bacterianas.

Recientemente, Jiménez y colaboradores (1993) han comparado el lavado broncoalveolar (BAL) con el cepillado bronquial (BAS) en 40 pacientes con NAC grave sin tratamiento previo, obteniendo en ambos casos una eficacia similar en torno al 70%, con 10^3 UFC/ml de dilución como punto de corte.

Sin embargo, la broncoscopia no está exenta de riesgos para el paciente: se ha descrito fiebre autolimitada (16%), neumonía (6%) y fallecimiento (1%) relacionados con la técnica (Pereira et al, 1975). Además, precisa considerables medios técnicos y personal especializado, limitando su empleo como técnica invasiva de uso clínico habitual.

De entre todas las técnicas diagnósticas invasivas, la punción transtorácica aspirativa (PTA) es la que ocasiona menor disconfort para el enfermo y no precisa personal especializado para su ejecución (Zalacaín et al, 1993).

5.2.1.2.2. La punción transtorácica aspirativa (PTA)

La punción transtorácica aspirativa (PTA) ha sido utilizada para el diagnóstico de

enfermedades pulmonares desde el siglo pasado. En 1883, Leyden obtuvo microorganismos de un paciente con neumonía (Leyden, 1883). Tres años más tarde, Menetrier fue el primero en diagnosticar un cáncer de pulmón mediante esta técnica (Menetrier, 1886). Desde entonces, la PTA ha sido utilizada con variable entusiasmo -por sus potenciales complicaciones- y diferentes resultados -dependiendo de la población seleccionada-, a lo largo de este siglo (Tabla 1-11).



Serie	Casos (n)	Aguja (calibre)	Población seleccionada	Diagnóstico (%)	Neumotórax (%)
Sappington, 1936	68	18G	neumonía lobar	79	1
Disney, 1956	17	16-18G	neumonía estafilocócica	82	24
Gherman, 1965	11	22G	inmunodeprimidos	82	36
Johnson, 1970	35	22G	niños con neoplasia	57	6*
Greenman, 1975	15	18G	inmunodeprimidos	60	9*
Chaudary, 1977	228	20G	niños inmunodeprimidos	53	32

Tabla 1-11 Eficacia y complicaciones de la PTA en diversos estudios.

*Neumotórax drenados (%).

En la década de los sesenta, LA PTA experimentó un importante auge con la introducción de la radioscopia biplana y las agujas finas de calibre 18-20G, al comprobarse una drástica reducción en el número y gravedad de las complicaciones (Ayerbe y colaboradores, 1993).

En los últimos años, la introducción de agujas de punción ultrafinas (calibre 25G), han llevado, primero a Zavala y Schoell (1981), y después, a Manresa y Dorca (1991), a una revisión en detalle de su metodología, eficacia y seguridad. La drástica reducción de efectos secundarios asociada a una sensibilidad mantenida, han favorecido que diversos grupos de trabajo depositen su confianza en la PTA como técnica invasiva de obtención de muestras respiratorias.

El valor diagnóstico de la PTA frente a técnicas broncoscópicas fue confirmado por Moser y colaboradores (1982) en un modelo canino experimental de neumonía por Streptococcus pneumoniae, en el que la PTA alcanzó la mejor relación sensibilidad/especificidad comparada con las otras técnicas.

Las distintas series revisadas ofrecen datos tan dispares en cuanto a la sensibilidad de la técnica como el 29% de Burt y colaboradores (1981) y el 91% de Wallace y colaboradores (1985), estando la media, según la revisión de 1440 punciones realizada por Bartlett (1994), en un 56%. Dicha variabilidad es atribuida al tipo de población seleccionada, la metodología aplicada, el tipo de afección radiológica, el control radioscópico o al tratamiento antibiótico previo. Así, mientras Zavala y Schoell (1981) obtuvieron una sensibilidad del 83% empleando control radioscópico, en el análisis de Dorca (1988), la sensibilidad alcanzó el 56.6% sin ayuda radioscópica. Por otro lado, Davison y colaboradores (1976) incluyen en su serie pacientes no tratados previamente, alcanzando una sensibilidad del 80%, mientras que en la serie de Palmer y colaboradores (1980), con una sensibilidad del 46%, el 81% de los pacientes habían recibido tratamiento antibiótico previo. Recientemente, Zalacaín y colaboradores (1995), han establecido una relación causal directa e independiente entre la positividad de la técnica y, tanto la no existencia de tratamiento antibiótico previo, como el tamaño del infiltrado pulmonar (mayor porcentaje de positividad en infiltrados lobares que segmentarios).

La especificidad de esta técnica alcanza rangos cercanos al 100%, si se excluyen los

contaminantes de la piel. Resultados falsos positivos, como un único caso descrito en la serie de Palmer y colaboradores (1980), sólo han merecido una atención anecdótica en la literatura.

El aspecto más controvertido de la PTA hace referencia a sus complicaciones. Sin embargo, el número e importancia de éstas, ha disminuido considerablemente desde que se introducen agujas de pequeño calibre para la realización de la técnica. Así, en los casos en que se emplearon agujas de calibre grueso, el porcentaje de neumotórax se situó en torno al 20%, aunque algunas series alcanzaron el 31%, y la incidencia de hemoptisis osciló entre el 3% y el 10%. Con la introducción de agujas ultrafinas, en la serie de Zavala y Schoell (1981), las cifras de neumotórax y hemoptisis son del 8% y 4% respectivamente, mientras que Dorca (1988), con una serie más amplia, alcanza niveles del 4% y 4% respectivamente. La tolerancia a la técnica, por otro lado, ha sido escasamente valorada en las series publicadas. Un reciente estudio en el que se valora este aspecto, sugiere que la técnica fue bien tolerada por los pacientes, pues sólo el 2% tuvo dolor torácico post-punción (Zalacaín et al, 1993).

Recientes trabajos han determinado la eficacia de la PTA entre grupos de población seleccionados. Así, Llorente y colaboradores (1993), analizaron 36 enfermos con edad superior a 65 años y NAC, consiguiendo una eficacia diagnóstica del 42%. Falguera y colaboradores (1993) por otro lado, estudiaron la eficacia de la PTA en 45 pacientes con infección por VIH y neumonía, obteniendo una sensibilidad global del 61.7%.

5.2.2. Técnicas relativas al procesamiento de muestras

5.2.2.1. Detección de antígenos bacterianos

5.2.2.1.1. Generalidades

Tradicionalmente, el microbiólogo ha pretendido aislar los organismos patógenos en cultivos puros, en un medio artificial fuera del organismo humano. De este modo, la morfología, actividad bioquímica y patrón de sensibilidad a los antimicrobianos podrían ser examinados y evaluados. En el caso de las enfermedades virales, la identificación del patógeno requiere la observación de un efecto citopático particular en un cultivo celular predefinido. Este es un criterio que demanda un alto grado de complejidad en el laboratorio y con frecuencia un periodo de incubación relativamente largo. Sólo se podía determinar la etiología de una infección o enfermedad mediante la identificación definitiva. Un segundo método de diagnóstico, menos satisfactorio, ha sido la demostración -mediante un aumento significativo del título- de una respuesta de anticuerpos específicos humorales contra el microorganismo en cuestión. Por lo tanto, para un diagnóstico lógico eficiente, el clínico debe poder reducir las opciones con respecto a las posibles causas de enfermedad, de modo que puedan probarse los antígenos correspondientes con el suero del paciente. Es obvio que sería prohibitivo probar el suero del paciente con todos los antígenos posibles. Además, los anticuerpos tardan con frecuencia dos semanas en aparecer. Por otra parte, el uso de la elevación del título de anticuerpos como criterio para el diagnóstico ha dejado de ser universalmente aplicable a medida que cada vez sobreviven más pacientes inmunocomprometidos en quienes la producción de anticuerpos está severamente deprimida o anulada. Además, se ha observado que muchos pacientes pueden presentar como respuesta a ciertos estímulos antigénicos una elevación no específica del título de anticuerpos, complicando la interpretación de las pruebas serológicas (Finegold y Baron, 1989). La ciencia moderna ha desarrollado técnicas nuevas, inconcebibles en los tiempos de Pasteur, que facilitan la tarea de los microbiólogos actuales. Las exigencias que se plantean tienden a pruebas de diagnóstico específicas más rápidas, evitando el clásico periodo de espera del desarrollo de los microorganismos, y a pruebas para detectar antígenos producidos por los patógenos sin esperar la respuesta de anticuerpos.

En 1896, Gruber y Durham observaron que el "antisuero" tenía la capacidad de agrupar algunas células bacterianas, sugiriendo la posibilidad de utilizar con fines diagnósticos este fenómeno. Fueron Topley, Wilson y Duncan, los que pocos años después realizaron lo que se ha denominado el primer test diagnóstico de aglutinación. Almacenaron "antisueros" contra los principales microorganismos; cuando se pensaba que uno de estos gérmenes se encontraba presente en un cultivo mixto, se añadía el antisuero contra dicho germen aglutinando solamente la zona donde se encontraba el microorganismo. Sugirieron que esta técnica podía ser aplicada para el diagnóstico de enfermedades pulmonares o entéricas incluso antes de obtener una identificación por cultivo (Willians, 1970).

Dejando a parte estas optimistas consideraciones, la experiencia aportada por Topley, Wilson y Duncan supuso la base para el posterior desarrollo de las técnicas de detección de antígeno bacteriano.

5.2.2.1.2. Técnicas de Aglutinación de partículas

La aglutinación es una prueba serológica que implica la interacción del anticuerpo con antígenos insolubles o particulados, como bacterias, células de mamíferos, eritrocitos o antígenos solubles acoplados a partículas mayores que ellos. La adición de un anticuerpo multivalente a un antígeno tiene como resultado la aglutinación de las partículas que llevan el antígeno. En esta reacción, el anticuerpo es conocido con el nombre de aglutinina. Dos tipos de inmunoglobulinas pueden participar en las reacciones de aglutinación: la inmunoglobulina M (IgM) y la IgG. La IgM aparece en cantidad suficiente 1 o 2 días después de la infección. Su gran tamaño (850.000 dalton) y sus 10 lugares posibles de unión, hacen que la IgM sea muy eficaz a la hora de agrupar bacterias para su posterior fagocitosis por células del sistema mononuclear-fagocítico. IgG aparece más tarde en el curso de la infección. A diferencia de la IgM, la IgG puede encontrarse en el suero durante años comportándose como una partícula de defensa continua o vacuna. Su menor tamaño y sus 2 lugares de unión le hacen unas 850 veces menos eficiente a la hora de aglutinar partículas.

La aglutinación se produce en dos etapas: en la primera etapa, el anticuerpo se une al determinante antigénico; en la segunda, las partículas adyacentes se unen entre sí hasta que se forman grandes agregados visibles.

Las moléculas de anticuerpos pueden fijarse a la superficie de partículas de látex. Dado que en cada partícula de látex se fija un gran número de moléculas de anticuerpos, existen en consecuencia numerosos sitios expuestos capaces de unirse al antígeno. Si la solución en estudio contiene el antígeno, éste se fijará a los sitios activos del anticuerpo expuestos sobre las partículas de látex, formando agregados unidos por reacciones cruzadas entre varias partículas. El mayor tamaño de las esferas de látex facilita la visualización de la reacción. Las reacciones de aglutinación que utilizan eritrocitos como soporte se denominan reacciones de **hemaglutinación**. La técnica de **coaglutinación** permite una mejor visualización de las reacciones de aglutinación utilizando, en lugar de partículas de látex, células de *S. aureus* (cepa Cowan I) que contienen en la pared celular una alta proporción de proteína A, que fijan sólo el extremo de las cadenas pesadas de los anticuerpos, dejando libres los dos extremos reactivos para fijarse a los antígenos.

Las pruebas de aglutinación pueden ser de dos tipos: en portaobjeto y en tubo. En el primero, se mezclan las suspensiones de antígeno y antisuero en un portaobjetos de cristal y se observa el agrupamiento rápido de las partículas. Las técnicas de aglutinación en tubo son semicuantitativas, ya que la suspensión del antígeno se añade a diluciones seriadas del antisuero. Después de la incubación, las partículas se aglutinan y rompen la suspensión.

El pH, osmolaridad y concentración iónica de la solución afectarán al grado de

aglutinación, de modo que las condiciones en las que se realiza este procedimiento deben ser estandarizadas. Heidelberger y colaboradores analizaron los parámetros que gobiernan la aglutinación (Tinghitella y Edberg, 1991). Estos, emplearon en un principio el método de precipitación cuantitativa para medir la cantidad de anticuerpo que estaba presente en un antisuero. Se realizaba utilizando un antígeno de la cápsula de polisacáridos del neumococo y antisuero de conejo sensibilizado contra él. Puesto que el antígeno de naturaleza polisacárida no contiene nitrógeno, en este sistema se podía medir la cantidad de anticuerpos presentes en el precipitado midiendo su contenido en nitrógeno. Para obtener medidas precisas era necesario, en primer lugar, eliminar el resto de las proteínas del suero que participan en reacciones antígeno-anticuerpo (por ejemplo, el complemento); además, los sobrenadantes procedentes de cada mezcla de antígeno y anticuerpo se analizaban mediante la prueba del anillo para averiguar la cantidad de antígeno o anticuerpo residual. De esta manera, fue posible identificar tres zonas principales en la reacción de precipitación: la zona de exceso de anticuerpo o **prozona**, la zona de proporciones óptimas o **zona de equivalencia**, y la zona de exceso de antígenos o **postzona**.

En la zona de exceso de anticuerpo hay una gran cantidad de anticuerpo en proporción a la cantidad de antígeno presente. En esta situación, sólo hay una pequeña cantidad de precipitación y en los sobrenadantes se detecta anticuerpo libre, pero no antígeno libre.; ello se debe a la saturación de los sitios antigénicos por el exceso de anticuerpos: se forman complejos antígeno-anticuerpo pero no tiene lugar la formación de retículos, necesaria para que haya precipitación. Según aumenta la concentración de antígeno en presencia de una cantidad constante de anticuerpo, también aumenta la cantidad de precipitación hasta que se alcanza la equivalencia, es decir, las proporciones óptimas. En este punto, la precipitación es máxima y no se detectan antígenos ni anticuerpos libres en el sobrenadante de dichas mezclas; así pues, todo el antígeno y todo el anticuerpo se habrán combinado y habrán precipitado.

La cantidad de anticuerpo presente en el antisuero podrá determinarse con exactitud midiendo el contenido en proteínas del precipitado formado en estado de equivalencia. Si se incrementa la concentración de antígeno, disminuirá la cantidad de precipitado y se detectará antígeno libre, pero no anticuerpo libre, en los sobrenadantes. Esta es la zona de exceso de antígeno.

La disminución de la formación de precipitado en ella se debe a la saturación de los sitios del anticuerpo por el exceso de antígeno, que evita de nuevo la formación de retículos ([Figura 1-1](#)).

5.2.2.1.3. Técnicas de detección de antígeno y NAC

Hemos tenido la oportunidad de asistir, en los últimos quince años, a la fabricación y comercialización de una ingente cantidad de "Kits" o preparados para la realización de técnicas de detección de antígenos bacterianos y, en consecuencia, la literatura médica se encuentra invadida por numerosos trabajos que intentan validar estos "kits" comerciales para el uso clínico (Tinghitella y Edberg, 1991).

En el ámbito de la NAC donde el *S. pneumoniae* se considera protagonista, la búsqueda por encontrar una técnica que mejore el rendimiento de los métodos de diagnóstico tradicionales y proporcione al clínico un diagnóstico rápido, ha desencadenado un aluvión de trabajos encaminados a detectar el antígenos de neumococo en diversos fluidos del organismo.

Streptococcus pneumoniae elabora toxinas y diversos marcadores de superficie, que son inmunógenos y, por tanto, pueden ser detectados mediante inmunoensayos (Tabla 1-12).

Cápsula	antígenos capsulares polisacáridos
Pared celular	polisacárido C proteína M proteína R
Toxinas	pneumolisina partícula productora de púrpura neuraminidasa autolisinas

Tabla 1-12 Antígenos de superficie y toxinas de *S. pneumoniae*

La mayoría de los trabajos realizados hasta el momento se han encaminado a la detección de dos antígenos: el polisacárido C neumocócico, que es un ácido teicoico, importante constituyente de la pared bacteriana y ligando de la proteína C reactiva; por otro lado, el polisacárido capsular neumocócico forma parte de la cara externa de la pared bacteriana y consta de 83 serotipos diferentes, 23 de los cuales constituyen la actual vacuna antineumocócica.

Resulta difícil comparar los diferentes trabajos realizados hasta el momento, debido a la variedad de las técnicas empleadas, los antígenos investigados y la población seleccionada (Tabla 1-13).

Autor	% de detección de antígeno neumocócico			
	esputo	suero	orina	líquido pleural
BTS*(1987)	86	9	45	-
Macfarlane (1982)	72	11	64	-
Tugwell (1975)	79	29	54	-
Örtqvist (1989)	68	-	-	-
Boersma (1991)	94	-	-	-
Coonrod (1976)	-	41	-	-
Boersma (1993)	-	-	-	88

Tabla 1-13 Detección de antígeno capsular de *Streptococcus pneumoniae* en diversas muestras clínicas de sujetos con neumonía adquirida en la comunidad.

*: British Thoracic Society

Del estudio de estas investigaciones logramos obtener la siguiente información:

a) Son tres las técnicas de detección de antígeno empleadas con más frecuencia: La contrainmunolectroforesis (CIE), la aglutinación y la técnica de enzimoimmunoanálisis (ELISA). Se han realizado estudios comparativos con las tres técnicas concluyendo que la técnica de ELISA es la más sensible y la CIE la menos sensible. In vitro, la ELISA es 5-10 veces más sensible que las técnicas de aglutinación, y éstas, a su vez, son 5-10 veces más sensibles que la CIE (Farrington y Rubenstein, 1991). Cada técnica, por otro lado, tiene sus propias limitaciones. Así, la CIE no es capaz de detectar los serotipos neumocócicos 7 y 14. Las técnicas de aglutinación aplicadas en orina resultan poco sensibles; Coonrod (1974) demostró que el antígeno polisacárido capsular de neumococo en orina difiere bastante en sus características fisicoquímicas (menor peso molecular) de la forma nativa presente en los focos de infección; se ha sugerido también (Congeni et al, 1984), que la orina puede representar un entorno poco adecuado (pH, concentración iónica, etc) para las reacciones de aglutinación, mientras que quedaría neutralizada en la CIE que tiene lugar en el interior de un gel. La ELISA por fin, es la técnica más costosa en términos de tiempo y dinero, quedando reservada para trabajos específicos de investigación.

b) Queda demostrada la posibilidad de encontrar antígeno neumocócico en una gran variedad de líquidos orgánicos en el transcurso de una neumonía neumocócica. Con mayor facilidad se encuentra antígeno neumocócico en esputo, seguido de la orina. La facilidad para encontrar antígeno neumocócico en suero varía considerablemente entre los diversos estudios, diferencias probablemente derivadas de la variable metodología empleada. La especificidad de la detección de antígeno neumocócico en orina y suero no ofrece lugar a dudas. En cambio, un resultado positivo en esputo debe ser contemplado bajo la sospecha de corresponder a un colonizante más que a un patógeno. Así, se han detectado reacciones positivas en el 20% de voluntarios sanos (Venkatesan y Macfarlane, 1992). La posibilidad de reducir el porcentaje de falsos positivos mediante el lavado del esputo queda aún por resolver mediante estudios específicos. La facilidad con que el antígeno neumocócico es detectado en el líquido pleural, queda ensombrecida por la posibilidad de realizar esta técnica en las neumonías neumocócicas con derrame pleural, que en el mejor de los casos, no alcanza el 50% (Light, 1980). Recientemente, Jiménez y colaboradores (1994) han detectado antígeno neumocócico en el 54% de las neumonías neumocócicas mediante lavado broncoalveolar por broncoscopia y en el 53% de las neumonías de origen desconocido. El escaso número de ocasiones en que se requiere el uso de la broncoscopia para el diagnóstico de la NAC, empobrecen tan buenos resultados. En cambio, la utilización de la PTA, técnica más sencilla y cómoda para el paciente, ha llevado a Bella y colaboradores (1993), a detectar antígeno neumocócico en el 83.3% de los pacientes con neumonía neumocócica.

c) La sensibilidad de las técnicas de detección de antígeno no parecen afectarse por el tratamiento antibiótico previo. En presencia de 10^6 - 10^7 neumococos por ml, Holloway y colaboradores (1993), obtuvieron reacciones positivas durante las 72 horas de duración del experimento, independientemente de la adición de penicilina, e incluso cuando no existía ningún neumococo viable.

d) La posibilidad de detectar antígeno neumocócico hasta 25 semanas tras el comienzo de los síntomas (Van der Auwera, 1983) facilita el empleo de estas técnicas en cualquier momento evolutivo de la NAC.

5.2.2.2. Técnica de detección de genoma bacteriano por reacción en cadena de la polimerasa

(PCR)

5.2.2.2.1. Generalidades

La historia de la PCR aparece íntimamente relacionada con el conocimiento de los ácidos nucleicos y constituye, en la actualidad, el punto final de los avances de la biología molecular en este campo.

La historia del conocimiento de los ácidos nucleicos comienza en el año 1869 cuando Miescher descubrió en el núcleo de las células una sustancia de carácter ácido a la que llamó ácido nucleico (Dasí, 1994). En los años veinte de nuestro siglo, Feulgen, utilizando una tinción específica, descubrió que el DNA estaba situado en los cromosomas. A partir de este descubrimiento todo sucedió rápidamente. En 1944, Avery, McCleod y Mc Carty comprueban que el DNA es el portador de la información genética (Avery et al, 1944). En 1953, Watson y Crick revelan la estructura del DNA como una doble hélice complementaria que recuerda la estructura de una escalera de caracol (Watson y Crick, 1953). Durante la última década, un equipo de investigadores de Cetus Corporation desarrollan una técnica enzimática que le permite fabricar un número teóricamente ilimitado de copias de un fragmento de DNA (Eisenstein, 1990). Esta técnica, denominada por algunos autores, la **fotocopiadora biológica**, es la **reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**.

Básicamente, la PCR es un método *in vitro* para la síntesis enzimática de secuencias específicas de DNA, utilizando para ello 2 oligonucleótidos llamados cebadores, que hibridan en hebras y flancos opuestos del fragmento de DNA a amplificar. Este proceso se realiza mediante ciclos en los que varía la temperatura. En general, cada ciclo se divide en 3 pasos: 1) Desnaturalización del DNA (separación de las dos hebras, elevando la temperatura hasta los 95°C). 2) Unión de los cebadores a sus secuencias complementarias por descenso de la temperatura. 3) Adecuación de la temperatura para que pueda actuar la polimerasa y, de esta forma, sintetizar el fragmento de DNA que interese.

En cada ciclo se obtienen el doble de cadenas del ciclo anterior. En el supuesto de haber empezado con una sola doble cadena de DNA, después de 20 ciclos se dispondría de un millón de copias del fragmento amplificado (Oriola, 1991).

5.2.2.2.2. Componentes de la PCR

Para que pueda realizarse la PCR, son necesarios 5 elementos básicos: una solución de nucleótidos, una enzima polimerasa, unos iniciadores o primers, una solución tampón cuyo principal componente es el magnesio y el DNA diana.

a) Taq Pol I.

La enzima utilizada inicialmente en la PCR era el fragmento Klenow, procedente de la DNA polimerasa de *E. coli* (Mullis, 1987) y que posee una temperatura óptima de reacción de 37°C. Por ser termolábil se destruía a la temperatura requerida para separar las hebras del DNA, por lo que era necesario reponerla en cada ciclo de PCR. Este inconveniente pudo subsanarse gracias al descubrimiento de una DNA polimerasa de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive en aguas calientes a 75°C de temperatura. De esta bacteria se pudo extraer y clonar el gen que codifica su polimerasa, denominada **Taq polimerasa**, cuya estabilidad a 94°C le permite permanecer activa durante toda la reacción de PCR. El rendimiento de polimerización es de 35-100 nucleótidos por segundo y molécula a 72°C, incorporando un nucleótido erróneo cada 2 x 10⁴ nucleótidos.

b) Iniciadores.

También llamados "primers" o cebadores. Son moléculas de DNA monocatenario formadas por 15-20 nucleótidos. En la PCR se suelen utilizar 2, de manera que cada uno se acopla a cada hebra complementaria del DNA diana. Los iniciadores son necesarios porque la

polimerasa requiere pequeñas porciones de DNA doble para comenzar a polimerizar; así pues, el punto de inicio de la síntesis de nuevas moléculas de DNA lo establece la posición del iniciador. Los iniciadores, cuya secuencia es conocida, flanquean la región de DNA que interesa amplificar. Es condición indispensable que los iniciadores sean específicos del DNA a amplificar.

c) Solución de nucleótidos.

En la reacción de amplificación son necesarios los 4 nucleótidos que componen el DNA: dATP, dTTP, dCTP y dGTP. Se utilizan en solución a pH 7.0 y a concentraciones de cada uno equivalentes minimizando de esta forma los errores durante la polimerización.

d) DNA diana.

La concentración y la calidad del DNA obtenido del microorganismo son importantes para la eficacia de la PCR: el exceso o defecto del DNA diana provoca una disminución en el rendimiento de la reacción. Por ejemplo, en la amplificación de un segmento de 110 pb de la β -globina, si partimos de una concentración de 5×10^{-19} moles, observamos que el número de copias obtenido aumenta unas 200.000 veces con respecto a una concentración inicial de 5×10^{-15} moles.

e) Tampón de amplificación.

Sus componentes fundamentales son Tris-HCl, KCl y $MgCl_2$. La importancia de este último estriba en que una ligera variación en su concentración puede afectar al rendimiento de la población, al acoplamiento de los primers, a la temperatura de disociación del DNA diana, a la formación de uniones inespecíficas entre primers y a la actividad de la enzima.

5.2.2.2.3. La reacción

Son 3 las fases componentes de la reacción: **desnaturalización, acoplamiento y polimerización.**

Estas fases se repetirán n ciclos para obtenerse 2_n copias de una zona concreta del genoma.

a) Desnaturalización.

Se basa en la sensibilidad del DNA a la temperatura.

Cuando el DNA se calienta a elevadas temperaturas, se separan las 2 hebras que forman la cadena debido a la rotura de los enlaces de puentes de hidrógeno. Esta fase se lleva a cabo a una temperatura de 93-95°C durante 30"-2' ([Figura 1-2](#)).

b) Acoplamiento.

Por este procedimiento, los iniciadores buscan la molécula de DNA diana y se unen, cada uno al lugar específico de las hebras separadas del DNA desnaturalizado previamente. La temperatura para este proceso oscila entre 45-65°C y se aplica durante 30"-2' ([Figura 1-2](#)).

c) Polimerización.

En este paso, la enzima de polimerización comienza a copiar la hebra de DNA diana a partir del extremo 3' que le indica el iniciador. Este proceso se lleva a cabo a una temperatura de 70-74°C durante 30"-3' ([Figura 1-2](#)). El número de ciclos que se suelen realizar en cada PCR oscila entre 25-40. Con más de 40 ciclos no se aumenta el rendimiento de la reacción, incrementándose la cantidad de productos indeseables que causan "ruido de fondo" (efecto Plateau). Con 40 ciclos se pueden detectar amplicones generados a partir de 50 moléculas de DNA diana; con 30 ciclos, se debería partir de 10.000 moléculas de DNA diana para que sea detectable. La detección de los productos de PCR puede realizarse de diferentes formas; las más utilizadas son: 1) detección simple de los amplificados separados mediante electroforesis en geles de agarosa tras tinción con bromuro de etidio; 2) Detección mediante ELISA tras hibridación del amplificado con la sonda correspondiente.

5.2.2.2.4 Aplicación de la PCR en muestras de pacientes con NAC

La literatura médica de los últimos cinco años se encuentra invadida por trabajos que intentan estandarizar la PCR en el manejo de pacientes con NAC (Tabla 1-14).



Serie	Bacteria	Gen codificado	Productos amplificados (en pb*)	Muestra estudiada (n)	% PCR +	Especificidad
Hassan-King et al,1994	neurnococo	Lyt A (autolisina)	247	sangre (25)	100%	-
Rudolph KM et al, 1993	neumococo	Lyt A (autolisina) Pneurnolisina	445,553 559,649	sangre (30)	63% 75%	93%
Salo et al, 1994	neumococo	pneumolisina	348,208	suero (120)	100%	94%
Gillespie SH et al, 1994	neumococo	Lyt A (autolisina)		esputo (33)	92.8%	100%
Campbell LA et al, 1992	Chlamydia pneumoniae	PstI	437,229	frotis faríngeo (36)	100% cultivo 50% serología	100%
Grayston JT et al, 1993	Chlamydia pneumoniae	PstI	437	frotis faríngeo (54)	100% cultivo 75% serología	100%
Gaydos CA et al,1994	Chlamydia pneumoniae	16S rRNA	270	frotis faríngeo (136)	76.5% cultivo + DFA**	99%
Kai M et al, 1993	Mycoplasma pneumoniae	16S rRNA	88,172	frotis faríngeo (95)	73% cultivo	94%
Lúneberg E et al, 1993	Mycoplasma pneumoniae	Tu (tuf) (factor de elongación)	950	frotis faríngeo (102)	90% cultivo 73.6% serología	97%
Tjhie JH et al, 1994	Mycoplasma pneumoniae	16S rRNA	326	frotis+esputo+BAL (79)	88.1% detección de antígeno	
Matsiota-Bernard P et al, 1994	Legionella pneumophila	5S rRNA		esputo+ BAL (31)	91%	100%

Tabla 1-14 Detección de genoma bacteriano en muestras obtenidas de enfermos con NAC.

*pb: pares de bases.

**DFA: test de inmunofluorescencia directa.

Una revisión no exhaustiva de tales estudios, permite realizar las siguientes afirmaciones:

a) Es posible detectar genoma de Streptococcus pneumoniae en muestras de esputo, sangre y suero de pacientes con neumonía neumocócica con una sensibilidad variable dependiendo de la muestra elegida y de los primers seleccionados. Así, Hassan-king y colaboradores (1994) obtuvieron 20 resultados positivos de 20 hemocultivos positivos a Streptococcus pneumoniae. Se ha analizado la eficacia de distintos primers para detectar genoma neumocócico en 30 hemocultivos positivos: resulta más sensible amplificar el gen que codifica la pneumolisina (75%) que el de la autolisina (63%) (Rudolph et al, 1993).



Serie	Bacteria	Gen codificado	Productos amplificados (en pb*)	Muestra estudiada (n)	% PCR +	Especificidad
Hassan-King et al, 1994	neumococo	Lyt A (autolisina)	247	sangre (25)	100%	
Rudolph KM et al, 1993	neumococo	Lyt A (autolisina) Pneumolisina	445,553 559,649	sangre (30)	63% 75%	93%
Salo et al, 1994	neumococo	pneumolisina	348,208	suero (120)	100%	94%
Gillespie SH et al, 1994	neumococo	Lyt A (autolisina)		esputo (33)	92.8%	100%
Campbell LA et al, 1992	Chlamydia pneumoniae	PstI	437,229	frotis faríngeo (36)	100% cultivo 50% serología	100%
Grayston JT et al, 1993	Chlamydia pneumoniae	PstI	437	frotis faríngeo (54)	100% cultivo 75% serología	100%
Gaydos CA et al, 1994	Chlamydia pneumoniae	16S rRNA	270	frotis faríngeo (136)	76.5% cultivo + DFA**	99%
Kai M et al, 1993	Mycoplasma pneumoniae	16S rRNA	88,172	frotis faríngeo (95)	73% cultivo	94%
Lúneberg E et al, 1993	Mycoplasma pneumoniae	Tu (tuf) (factor de elongación)	950	frotis faríngeo (102)	90% cultivo 73.6% serología	97%
Tjhie JH et al, 1994	Mycoplasma pneumoniae	16S rRNA	326	frotis+esputo+BAL (79)	88.1% detección de antígeno	
Matsiota Bernard P et al, 1994	Legionella pneumophila	5S rRNA		esputo+BAL (31)	91%	100%

Tabla 1-14 Detección de genoma bacteriano en muestras obtenidas de enfermos con NAC.

*pb: pares de bases.

**DFA: test de inmunofluorescencia directa.

Salo y colaboradores (1994) analizaron la presencia de genoma neumocócico en 20 sueros de pacientes con infección neumocócica y hemocultivos positivos y en 100 sueros de individuos asintomáticos. Utilizando el gen que codifica la pneumolisina, la PCR fue positiva en los 20 (100%) enfermos y negativa en 94 (94%) de los 100 individuos asintomáticos. Al parecer, la excelente correlación encontrada entre PCR, hemocultivos y sueros queda ensombrecida por el escaso número de ocasiones en que se aísla el neumococo en sangre. Sin embargo, es posible que en infecciones neumocócicas invasivas, el neumococo alcance el torrente sanguíneo en escasa cantidad, probablemente inviable por la acción de los mecanismos de defensa del huésped o por la acción de los antibióticos; en esta situación, los hemocultivos permanecerían negativos mientras que la PCR podría detectar genoma bacteriano (Salo et al, 1994).

Son necesarios nuevos estudios que traten de valorar la eficacia de la PCR en sangre de pacientes con neumonía neumocócica y hemocultivos negativos (Hassan-King et al, 1994). La detección de genoma neumocócico en esputo, por otro lado, mostró una excelente correlación con los cultivos (92.8%) y con la detección de antígeno capsular neumocócico (100%); sin embargo, queda sujeta a discusión la especificidad de sus resultados (Gillespie et al, 1994).

b) La eficacia con que la PCR detecta genoma de Mycoplasma pneumoniae en el frotis faríngeo de pacientes infectados ha sido analizada por diversos autores. Bernet y colaboradores (1989) han obtenido resultados positivos con 10^2 - 10^3 microorganismos, mientras que Jensen y colaboradores (1989) encontraron el límite de detección en Mycoplasma pneumoniae encontrando una correlación del 73%; la PCR fue negativa en las 32 muestras con cultivos negativos y en 33 muestras de individuos asintomáticos (una de las cuales, con cultivo positivo). El gen que codifica el factor de elongación Tu (tuf), ha sido utilizado por Lüneberg y colaboradores (1993) para detectar Mycoplasma pneumoniae en 102 muestras de frotis faríngeo de pacientes con infección respiratoria. De las 21 muestras con cultivos positivos a Mycoplasma pneumoniae, 19 fueron confirmadas por PCR (sensibilidad: 90%); de las 62 muestras con cultivos negativos, la PCR fue negativa en las 62 ocasiones (especificidad: 100%); Además, 14 de 19 casos con serología positiva y cultivos negativos, dieron una señal positiva para PCR. Tjhie y colaboradores (1994), encontraron una correlación entre PCR y detección de antígeno de Mycoplasma pneumoniae del 88.1% en 79 muestras respiratorias, 24 de las cuales correspondían a lavados broncoalveolares. La existencia de PCR y cultivos positivos en muestras faríngeas de individuos sin enfermedad, sugiere la existencia de portadores asintomáticos de Mycoplasma pneumoniae. En tales casos, la utilización adicional de la serología permitiría distinguir entre infección aguda e infección persistente (Kuppeveld et al, 1994).

c) Chlamydia pneumoniae puede ser detectado, mediante PCR, en muestras faríngeas con una concordancia variable con los cultivos y la serología. Así, Campbell y colaboradores (1992) han amplificado el fragmento PstI en el frotis faríngeo de 8 pacientes con cultivo y serología positiva, 8 pacientes con cultivo negativo y serología positiva, y 20 pacientes con cultivo y serología negativos, mostrando una correlación del 100%, 50% y 100% respectivamente. Por otro lado, Grayston y colaboradores han utilizado el mismo primer para detectar Chlamydia pneumoniae en el frotis faríngeo de 54 estudiantes con infección respiratoria aguda, encontrando una correlación del 100% con los cultivos y del 75% con la serología. Por último, Gaydos y colaboradores (1994) utilizaron primers que amplifican el gen 16S rRNA en estudio comparativo con cultivo, serología y detección de antígeno en 56 pacientes con infección respiratoria y 80 individuos sanos. Utilizando el cultivo y la detección de antígeno como "gold standard", la sensibilidad y especificidad de la PCR fue de

76.5% y 99% respectivamente. Sin embargo, es escasa la concordancia observada entre PCR y serología que, en algunos estudios sólo alcanza el 50% de los casos (Campbell et al, 1992). De todas formas, el hecho de que la serología de C. pneumoniae sea positiva en el 18.8% de individuos asintomáticos y negativa en el 20% de enfermos permite dudar de los actuales valores diagnósticos de infección aguda por serología y de su comparación con los resultados de la PCR (Gaydos et al, 1994).

d) El genoma de Legionella pneumophila puede ser detectado tanto en esputo como en muestras obtenidas por lavado broncoalveolar (BAL), con una sensibilidad y especificidad del 91% y 100% con respecto al cultivo (Matsiota-Bernard et al, 1994). Estos resultados no permiten prescindir del cultivo de Legionella pneumophila como técnica estándar. Sin embargo, Martin y colaboradores (1993) analizando muestras ambientales, encontraron que el número de resultados positivos era mayor cuando se utilizaba la PCR (61 frente a 35).

Otros microorganismos implicados en infecciones respiratorias han sido estudiados mediante PCR. Así, Brisson-Noel y colaboradores (1991) encontraron una correlación del 97.4% entre PCR y cultivo para el diagnóstico de tuberculosis en 489 muestras clínicas. Wakefield y colaboradores (1991) por otro lado, fueron capaces de detectar genoma de Pneumocystis carinii en el 95% de las muestras obtenidas por BAL y en el 90% de las muestras de esputo mejorando sensiblemente los resultados de la tinción de plata. Recientemente, Nogués y colaboradores (1992) han conseguido mediante esta técnica incrementar el rendimiento de la tinción de plata en cerca del 30%, logrando diagnosticar el 92% de las infecciones por P. carinii en 25 muestras clínicas (12 de las cuales correspondían a punciones transtorácicas).

B) Objetivos del estudio

La mayoría de los estudios epidemiológicos sobre NAC no complicada realizados hasta el momento, han depositado su confianza en métodos tradicionales de diagnóstico microbiológico, como son: el cultivo de esputo, los hemocultivos y la serología. La escasa sensibilidad de sus resultados así como la controvertida especificidad de alguno de ellos, ha dado lugar a la existencia de estudios epidemiológicos con escaso porcentaje de casos diagnosticados, generando incertidumbre en el clínico en el momento de plantearse una conducta terapéutica determinada. Este hecho, plantea la necesidad de encontrar métodos de diagnóstico -tanto en la obtención de muestras como en su procesamiento- que mejoren el rendimiento de las técnicas convencionales.

Concretamos nuestros objetivos en los siguientes puntos:

- 1. Conocer el ambiente epidemiológico de la neumonía adquirida en la comunidad de Lleida.**
- 2. Valorar la eficacia de la punción transtorácica aspirativa como técnica de obtención de muestras respiratorias no contaminadas de pacientes con neumonía adquirida en la comunidad no complicada.**
- 3. Evaluar la utilidad de la detección de antígenos bacterianos como técnica de procesamiento de muestras obtenidas por punción transtorácica aspirativa.**
- 4. Documentar la eficacia de la detección de genoma bacteriano como técnica de procesamiento de muestras obtenidas por punción transtorácica aspirativa.**
- 5. Analizar el impacto diagnóstico de la inclusión de la punción transtorácica aspirativa y de las nuevas técnicas de diagnóstico microbiológico en estudios epidemiológicos sobre la neumonía adquirida en la comunidad.**

C) Material y métodos

1. Población a estudiar

Este estudio ha tenido lugar en el hospital universitario "Arnau de Vilanova" de Lleida, centro dotado de 500 camas, que constituye el centro hospitalario de referencia de 400.000 habitantes pertenecientes a la región sanitaria de Lleida (120.000 pertenecientes a Lleida capital), con un volumen de urgencias anuales en torno a las 50.000.

1.1. Criterios de inclusión en el estudio

Fueron incluidos en el estudio aquellos pacientes que cumplían los siguientes requisitos:

1. Pacientes con edad superior a los 14 años.
2. Atendidos en el área de urgencias de nuestro hospital.
3. Atendidos en el periodo comprendido entre 1.01.93-31.03.93.
4. Diagnosticados de neumonía adquirida en la comunidad.

El diagnóstico de neumonía adquirida en la comunidad se fundamentó en el cumplimiento de los siguientes criterios:

1. Presencia simultánea de fiebre o dos de las siguientes manifestaciones:
 - tos
 - expectoración purulenta
 - semiología de condensación
 - leucocitosis ($>10.000 /\text{mm}^3$)
 - deterioro gasométrico ($\text{pO}_2 < 80 \text{ mmHg}$)
2. Aparición radiológica de un infiltrado pulmonar.
3. Comienzo de los síntomas en los 10 días previos al ingreso.
4. Ausencia de ingreso hospitalario en los 7 días anteriores al estudio.

1.2. Parámetros clínicos analizados

Las características clínicas, analíticas, radiológicas y evolutivas de los pacientes seleccionados fueron almacenadas en una ficha de recogida de datos ([Figura 3-1](#)).

2. Obtención de muestras clínicas

2.1. Muestras clínicas habituales

Se intentó activamente conseguir una muestra de esputo. Al ingreso, y antes de comenzar la terapia antibiótica, se efectuaron dos hemocultivos. Asimismo, se obtuvieron muestras para serología en los días 1 y 30 del ingreso hospitalario. En aquellos casos con derrame pleural, se obtuvo una muestra mediante toracocentesis.

2.2. Muestra obtenida por punción transtorácica aspirativa

Fueron sometidos a punción transtorácica aspirativa (PTA) todos los pacientes incluidos en el estudio que no presentaron las siguientes contraindicaciones para la realización de la técnica:

1. Antecedentes de neumotórax
2. Presencia de bullas en la Rx de tórax
3. Alteraciones de la hemostasia, definida por una de las siguientes:
 - Tiempo de protrombina $< 60\%$
 - Cifra de plaquetas $< 50.000 /\text{mm}^3$
4. Tos no controlada
5. No obtención del consentimiento formal del paciente

Se empleó una aguja de punción lumbar calibre 25 G (Spinocan-R) sin utilizar premedicación ni control radioscópico. Se realizaron algunas modificaciones en la metodología descrita por Dorca (1988), con el fin de simplificar la técnica, de la siguiente forma:

1. Localización de la condensación mediante semiología y radiología convencional. Para la punción de segmentos superiores de lóbulos superiores, el paciente permanecerá sentado con la mano en la cintura y el hombro hacia delante, introduciendo la aguja en la línea paraescapular posterior. Para la punción de segmentos anteriores de lóbulos superiores, se introducirá en la intersección entre la línea medioclavicular y el 2º espacio intercostal anterior. Para la punción del lóbulo medio derecho, se introducirá la aguja en el 5º-6º espacio intercostal anterior, aproximadamente 1 cm por encima de la matidez hepática, en la línea mamilar. Para la punción de la llingula, la aguja se introducirá en el 5º-6º espacio intercostal anterior, en la línea axilar anterior. Para la punción de lóbulos posteriores, la aguja se introducirá en regiones posteriores, guiándose por la percusión y la auscultación.

2. Aplicación de las medidas habituales de asepsia cutánea en el lugar elegido para la punción.

3. Introducción de la aguja de punción lumbar con el mandril puesto, hasta llegar al punto deseado.

4. Retirar el mandril y conectar a una jeringa de 20 ml cargada con 8 ml de suero fisiológico.

5. Inyectar 6 ml en el punto elegido.

6. Mantener la aspiración efectuando movimientos rotatorios y de vaivén durante 30 segundos, a fin de recuperar un mínimo de 3 ml del suero inyectado.

7. Dejar de aspirar y retirar la aguja.

8. Conectar una aguja de cargar a la jeringa de 20 ml.

9. Inyectar el contenido recuperado del parénquima pulmonar en un tubo al vacío con anticoagulante, para su transporte y posterior almacenamiento.

10. Colocar al paciente en decúbito homolateral durante una hora.

Con el fin de cuantificar la yatrogenia y conocer así su grado de aplicabilidad, se practicó una radiografía de control a todos los pacientes sometidos a PTA y se realizó una exhaustiva encuesta de efectos secundarios ([Figura 3-2](#)).

3. Procesamiento de muestras obtenidas

3.1. Procesamiento de muestras habituales

En aquellos casos en que se recuperó esputo, las muestras con criterios de no contaminación mediante la tinción de gram (< 10 células epiteliales por campo y > 25 polimorfonucleares por campo), fueron cultivadas en los siguientes medios: agar sangre, agar chocolate, McConkey, tio-glicolato y medio específico para Legionella pneumophila. Además, en pacientes con infección por VIH, se llevó a cabo una tinción de Zhiel-Neelsen y de plata-metenamina, así como el cultivo en medio de Lowenstein-Jansen y PCR para Pneumocystis carinii. Tanto los hemocultivos obtenidos como aquellos casos en que el líquido pleural se encontró disponible para estudio, fueron procesados según la técnica y medios de cultivo habituales en nuestro Centro.

Las muestras obtenidas para serología fueron analizadas, de manera pareada, para la existencia de anticuerpos contra los microorganismos expuestos en la Tabla 3-1.

Microorganismo	Test serológico	kit comercial
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	VIRCELL SL (España)
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Microinmunofluorescencia indirecta (McIFI) para IgG	VIRCELL SL (España)
<i>Chlamydia psittaci</i>	Fijación del complemento	BEHRINGWERKE (Germany)
<i>Legionella pneumophila</i>	Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	VIRCELL SL (España)
<i>Coxiella Burnetti</i>	Fijación del complemento	BEHRINGWERKE (Germany)
Virus Influenza A	Fijación del complemento	BEHRINGWERKE (Germany)

Tabla 3-1 Técnicas serológicas empleadas en el estudio

3.2. Procesamiento de muestras obtenidas por PTA

3.2.1. Métodos convencionales

Parte de la muestra obtenida por PTA fue cultivada en los siguientes medios: agar sangre, agar chocolate, Mc Conkey, tio-glicolato y medio enriquecido para Legionella pneumophila.

3.2.2. Técnica de detección de antígenos

Parte de la muestra recuperada por PTA fue utilizada para la detección de antígeno polisacárido capsular de Streptococcus pneumoniae y Haemophilus influenzae tipo b, mediante la técnica de aglutinación con látex. Se utilizó un kit de reactivos (Slidex meningite kit) comercializado por bioMerieux (Francia), siguiendo las indicaciones del fabricante: calentamos 0.4 ml de la muestra a 95°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. Los resultados (positivo/negativo) fueron leídos por dos observadores de manera simultánea y se realizaron controles positivos en cada determinación.

3.2.3. PCR

Se realizó la técnica de PCR para la búsqueda de genoma de los siguientes microorganismos: Streptococcus pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae y Chlamydia pneumoniae. En caso de negatividad para las pruebas anteriores, se practicó PCR para la

búsqueda de genoma de Legionella pneumophila. En caso de infección por VIH y afectación pulmonar intersticial, se añadió a la batería de pruebas convencionales la PCR para la búsqueda de genoma de Pneumocystis carinii. La técnica de PCR se efectuó según los pasos siguientes:

a) Extracción del DNA.

Tomamos 0.5 ml de la muestra y efectuamos 3 lavados con agua destilada con el fin de provocar la lisis total de los hematíes. A continuación, resuspendimos el sedimento con 300 ml de tampón de lisis (0.01 M Tris pH 7.8, 0.005 M de EDTA, 0.5% SDS) añadiendo 50 ml/ml de proteinasa K e incubando 1 hora a 37°C. Mezclamos la muestra con 400ml de fenol-cloroformo y centrifugamos 5 minutos a 12.000 rpm con el fin de 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 centrifugamos de nuevo durante 10 minutos. Decantamos nuevamente y procedimos a la evaporación de los restos de alcohol. Resuspendimos el DNA con 100 ml de agua destilada y pasamos a realizar la fase de amplificación.

b) Amplificación del DNA.

Para la amplificación del DNA se utilizó un termociclador (modelo IHB 2024, Cherlyn Electronics Ltd. Cambridge. England). La síntesis de nucleótidos para la elaboración de primers fue realizada por CRUACHEM Ltd (UK). Tanto la Taq polimerasa como los nucleótidos difosfato fueron suministrados por GIBCO BRL, Life Technologies (USA). Los primers utilizados, los ciclos y temperaturas empleadas, así como los productos amplificados fueron diferentes de acuerdo con el DNA diana (Tabla 3-2). La mezcla previa a la amplificación se realizó según técnica previamente descrita (Saiki et al, 1988).

c) Visualización.

Visualizamos el producto amplificado por separación electroforética en un gel de agarosa al 3% con bromuro de etidio incorporado y observando en un transiluminador. La identificación del tamaño de la banda se realizó mediante escalera de marcadores de pesos moleculares (100 pb DNA ladder; GIBCO BRL, Life Technologies Inc, USA). Se realizaron controles positivos y negativos en cada determinación.

Microorganismo	Ref	Primers	Temperaturas de amplificación
Streptococcus pneumoniae	Dowson (1989)	Pn2x up (CGTGGGACTATTTATGACCGAAATGG) Pn2x down (AATTCCAGCACTGATGGAAATAACATATTA) Gen codificado: PBP 2x Producto de amplificación: 1.500 pb*	-1 ciclo (4 min/ 95°C) -40 ciclos (1,5 min/95°C) (1.5 min/56°C) (6 min/70°C) - 1 ciclo (10 min/70°C)
Mycoplasma pneumoniae	Bernet (1989)	MP5-1(GAAGTTATGGTACAGGTTGG) MP5-2 (ATTACCATCCTTMGTAAGG) Gen codificado: fragmento Producto de amplificación: 144 pb*	- 1 ciclo (4 min/94°C) - 40 ciclos (1 min/94°C) (1 min/55°C) (1 min/72°C) - 1 ciclo (10 min/72°C)
Chlamydia pneumoniae	Campbell (1992)	HL-1(GTTGTTCATGAAGGCCTACT) HR-1 (TGGATAACCTACGGTGTGTT) Gen codificado: fragmento Pst I Producto de amplificación: 437 pb*	- 1 ciclo (4 min/94°C) - 40 ciclos (1 min/94°C) (1 min/55°C) (1 min/72°C) - 1 ciclo (10 min/72°C)

Legionella Pneumophila	Starnbach (1989)	LEG-1 (GTCATGAGGAATCTCGCTG) LEG-2 (CTGGCTTCTTCCAGCTTCA) Gen codificado: fragmento Producto de amplificación: 800 pb*	- 1 ciclo (4 min/94°C) - 40 ciclos (1 min/94°C) (1 min/55°C) (1 min/72°C) - 1 ciclo(10 min/72°C)
Pneumocystis carinii	Kitada (1991)	5S-Sense (AGTTACGGCCATACCTCAGA) 5S-Antisense (AAAGCTACAGCACGTCGTAT) Gen codificado: 5S ribosomal (rRNA) Producto de amplificación: 120 pb*	- 1 ciclo (4 min/94°C) - 40 ciclos (1 min/94°C) (2 min/55°C) (2 min/72°C) - 1 ciclo (10 min/72°C).

Tabla 3-2 Primers y temperaturas de amplificación utilizados para la detección de genoma, de Streptococcus pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia pneumoniae y Pneumocystis carinii*pb: pares de bases.

Sensibilidad de la PCR.

Inoculamos muestras obtenidas por PTA de pacientes afectados de procesos respiratorios no neumocócicos con diferentes diluciones de una suspensión de Streptococcus pneumoniae. Una parte de la muestra la sembramos en agar sangre y otra parte igual fue procesada para PCR. La PCR fue positiva a diluciones de 150, 100, 54 y 5 UFC/ml y negativa a dilución de 11 UFC/ml. La falta de cultivos celulares del resto de microorganismos impidió la práctica de un estudio propio de sensibilidad.

4. Criterios diagnósticos

4.1 Criterios de diagnóstico clínico

Fueron considerados como afectados de **neumonía clínicamente típica** aquellos casos que cumplieran al menos 3 de los siguientes requisitos: Inicio brusco de los síntomas, expectoración purulenta, dolor pleurítico o semiología de condensación pulmonar. Fueron considerados como afectados de **neumonía clínicamente atípica** aquellos casos que no cumplieran criterios para el diagnóstico de neumonía típica.

4.2. Criterios de diagnóstico microbiológico

Se consideró que existía un diagnóstico microbiológico de certeza cuando se cumplieran uno o más de los siguientes criterios:

1. Aislamiento de un patógeno obligado por cultivo o tinción específica en esputo
2. Aislamiento de un microorganismo por hemocultivo
3. Aislamiento de un microorganismo en líquido pleural
4. Aislamiento de un microorganismo en la muestra obtenida por PTA (en todos los casos se ha considerado a Staphylococcus epidermidis, como germen contaminante)
5. Detección de antígeno capsular de Streptococcus pneumoniae o Haemophilus influenzae en la muestra obtenida por PTA.
6. Detección de genoma perteneciente a Streptococcus pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia pneumoniae, Legionella pneumophila, Pneumocystis carinii o Citomegalovirus en la muestra obtenida por PTA
7. Detección de genoma de Pneumocystis carinii en el esputo
8. Diagnóstico por serología: evidencia de seroconversión ó títulos estables >20(para fijación del complemento), > 128 (para IFI), > 512 (para MIF)

5. Análisis estadístico

Tanto la PTA como las diversas técnicas de procesamiento microbiológico (cultivos, detección de antígenos y PCR) fueron analizadas en base a los criterios clásicos de eficacia diagnóstica ([Figura 3-3](#)). La **sensibilidad** de una prueba se define como la proporción de verdaderos positivos (VP) que se identifican correctamente como tales. La **especificidad** es el porcentaje de verdaderos negativos (VN) clasificados como tales por la prueba. El valor predictivo de una prueba positiva o **valor predictivo positivo** es la probabilidad de tener la enfermedad cuando la prueba es positiva. El valor predictivo de una prueba negativa o **valor predictivo negativo** es la probabilidad de no tener la enfermedad cuando la prueba es negativa. La **eficacia** de una prueba (también llamada exactitud, eficiencia o precisión global) se definió como la proporción de individuos clasificados correctamente como tales.

El análisis univariado ha sido realizado con el paquete estadístico SSPS/PC. Variables cualitativas: para la comparación de dos medias se ha utilizado la prueba de la t de student para datos no apareados, siempre que se cumpliera la condición de normalidad de la muestra cuando no se cumplía este requisito se ha aplicado la prueba de U de Mann-Whitney.

Variables cuantitativas: para la comparación de dos proporciones se ha utilizado la prueba de la Chi cuadrado, Chi cuadrado con corrección de Yates o la prueba exacta de Fisher, cuando han sido necesarias. Los valores de p inferiores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

En la práctica, los estrictos criterios diagnósticos elegidos, nos permiten obviar el cálculo de la especificidad y del valor predictivo positivo que, lógicamente, serán del 100%.



D) Resultados

1. Características de la población estudiada

Fueron incluidos en el estudio 118 pacientes consecutivos con el diagnóstico de NAC. La distribución por grupos de edad fue: 14 (entre 15-29 años), 37 (entre 30-49 años), 32 (entre 50-69 años), 35 (entre 70-89 años); 68 (57.6%) correspondían a hombres y 50 (42.3%) a mujeres. 41 (34.7%) tenían una edad superior a los 65 años, 35 (85.3%) de los cuales residían en su propio domicilio. 48 (40.6%) se encontraban afectados de enfermedad crónica previa, cuyo desglose aparece expuesto en la tabla 17. 47 (39.8%) habían recibido tratamiento antibiótico previo y 45 (38.1%) se encontraban en insuficiencia respiratoria aguda. 77 (65.2%) fueron ingresados en el hospital (dos en UCI) y 3 (2.5%) fallecieron (Tabla 4-2).

Enfermedad de base	n° total	%
SIDA	18	15.2
EPOC	11	9.3
Cardiopatía	7	5.9
Neoplasia	4	3.3
Hepatopatía crónica	3	2.5
Diabetes	2	1.6
Insuficiencia renal crónica	1	0.8
Accidente vascular cerebral	1	0.8
Lupus eritematoso	1	0.8

Tabla 4-1 Enfermedades subyacentes entre la población estudiada.

Edad media	51.3 (rango: 15-87)
Sexo	Varones 68 (57.6%)/Hembras 50 (42.3%)
Enfermedad crónica de base	48 (40.60%)
Tratamiento antibiótico previo	47 (39.8%)
Insuficiencia respiratoria	45 (38.1%)
Ingreso hospitalario	77 (65.2%)
Mortalidad	3(2.5%)

Tabla 4-2 Características generales de la población estudiada

De los 91 diagnósticos microbiológicos por gérmenes no oportunistas, 41 (45%) presentaban un síndrome clínico considerado como típico, y 50 (55%) un síndrome atípico. En la Tabla 4-3 se desglosan estos resultados en todos los microorganismos implicados.

Microorganismos	Síndrome clínico típico (% del total de casos típicos)	Síndrome clínico atípico (% del total de casos atípicos)
Streptococcus pneumoniae	18 (43.9%)	11(22%)
Mycoplasma pneumoniae	6(14.6%)	14(28%)
Chlamydia spp	8(19.5%)	16(32%)
Haemophilus influenzae	3(7.3%)	4(8%)
virus Influenza A	4(9.7%)	2(4%)
Enterococcus faecium	1(2.4%)	-
Streptococcus pyogenes	-	1(2%)
Streptococcus viridans	1(2.4%)	-
Coxiella burnetii	-	2(4%)
TOTAL	41(45%)	50(55%)

Tabla 4-3 Distribución de microorganismos no oportunistas por síndrome de presentación clínica

2. Resultados microbiológicos

2.1. Generalidades

De los 118 casos incluidos en el estudio, fueron diagnosticados un total de 99, lo que supone el 83.8% del total ([Figura 4-1](#)).

En 3 ocasiones se consideró que existía una infección mixta (Tabla 4-4), lo que dio lugar a un total de 102 diagnósticos microbiológicos: 29 (24.5% del total de individuos en

estudio) correspondían a infección por Streptococcus pneumoniae, 24 (20.3%) a infección por microorganismos del género Chlamydia, 20 (16.9%) a infección por Mycoplasma pneumoniae, 7 (5.9%) a infección por Haemophilus influenzae, 7 (5.9%) a infección por Pneumocystis carinii, 6 (5%) a infección por virus de la Influenza A, 3 (2.5%) a infección por Mycobacterium tuberculosis, 2 (1.6%) a infección por Coxiella burnetti, 1 (0.8) a infección por Streptococcus viridans, 1 (0.8%) a infección por Streptococcus pyogenes, 1 (0.8%) a infección por Enterococcus faecium y 1 (0.8%) a infección por Cryptococcus neoformans (Tabla 4-5).

Caso	Microorganismos
1	Streptococcus pneumoniae + Chlamydia pneumoniae
2	Streptococcus viridans + Chlamydia pneumoniae
3	Mycobacterium tuberculosis + Pneumocystis carinii

Tabla 4-4 Casos de NAC con aislamiento microbiano doble

Microorganismo	Número	% del total de casos
Streptococcus pneumoniae	29	24.5
Chlamydia spp	24	20.3
Mycoplasma pneumoniae	20	16.9
Haemophilus influenzae	7	5.9
Pneumocystis carinii	7	5.9
Influenza A virus	6	5.0
Mycobacterium tuberculosis	3	2.5
Coxiella burnetti	2	1.6
Streptococcus viridans	1	0.8
Streptococcus pyogenes	1	0.8
Enterococcus faecium	1	0.8
Criptococcus neoformans	1	0.8

Tabla 4-5 Microorganismos aislados en nuestro estudio.

La distribución de los microorganismos por edades de población quedó de la siguiente manera:

a) Individuos con edad inferior a 65 años sin patología de base.

De los 39 diagnósticos microbiológicos realizados en este grupo de población 15 (38.4%) correspondían a infección por Mycoplasma pneumoniae, 13 (33.3%) a infección por

microorganismos del género *Chlamydia*, 6 (15.3%) a infección por *Streptococcus pneumoniae*, 2 (2.5%) a infección por *Coxiella burnetti*, 1 (2.5%) a infección por *Haemophilus influenzae*, 1 (2.5%) a infección por *Streptococcus viridans*, y 1 (2.5%) a infección por el virus de la *Influenza A* (Figura 4-2).

b) Individuos con edad superior a 65 años con o sin patología de base.

De los 35 diagnósticos microbiológicos realizados en este grupo de población, 16 (45.7%) correspondían a infección por *Streptococcus pneumoniae*, 8 (22.8%) a infección por microorganismos del género *Chlamydia*, 4 (11.4%) a infección por virus *influenza A*, 2 (5.7%) a infección por *Mycoplasma pneumoniae*, 2 (5.7%) a infección por *Haemophilus influenzae*, 1 (2.8%) a infección por *Enterococcus faecium*, 1 (2.8%) a infección por *Streptococcus pyogenes* y 1 (2.8%) a infección por *Pneumocystis carinii* (Figura 4-3).

c) Individuos con enfermedad de base.

De los 44 diagnósticos microbiológicos realizados en este grupo de población, 14 (31.85) correspondían a infección por *Streptococcus pneumoniae*, 7 (15.9%) a infección por *Pneumocystis carinii*, 6 (13.6%) a infección por *Haemophilus influenzae*, 5 (11.3%) a infección por *Mycoplasma pneumoniae*, 4 (9%) a infección por *Chlamydia pneumoniae*, 3 (6.8%) a infección por el virus de la *influenza A*, 3 (6.8%) a infección por *Mycobacterium tuberculosis*, 1 (2.2%) a infección por *Streptococcus pyogenes* y 1 (2.2%) a infección por *Cryptococcus neoformans* (Figura 4-4).

El SIDA constituyó la enfermedad de base más frecuente. De los 18 pacientes con SIDA estudiados, 8 (44.4%) estaban infectados por gérmenes considerados como convencionales (*Streptococcus pneumoniae*: 5, *Haemophilus influenzae*: 2, *Chlamydia pneumoniae*: 1). Todos los casos de infección por *Pneumocystis carinii* y *Mycobacterium tuberculosis* correspondían a individuos con infección por VIH.

2.2. Resultados de los métodos convencionales

Consideramos métodos convencionales a las tinciones y cultivo de esputo, los hemocultivos, la serología y el cultivo del líquido pleural.

Fue posible obtener muestra de esputo en 49 (41.5%) ocasiones y obtuvimos el diagnóstico microbiológico en 5/49 (10.2%) casos (Tabla 4-6).

Casos	Microorganismo	tinción micobacterias ZN*/cultivo	tinción plata/PCR P. carinii
1	M. tuberculosis	negativo/positivo	negativo/negativo
2	P. carinii	negativo/negativo	positivo/positivo
3	M. tuberculosis	negativo/positivo	negativo/negativo
4	P. carinii	negativo/negativo	positivo/positivo
5	M. tuberculosis P. carinii	positivo/positivo	positivo/positivo

Tabla 4-6 Resultados de las muestras diagnósticas de esputo.

* ZN: tinción de Ziehl-Neelsen

Se obtuvieron hemocultivos en los 118 pacientes incluidos en el estudio y sus resultados ofrecieron un diagnóstico microbiológico en 10/118 (8.4%) casos: 9 correspondían

a Streptococcus pneumoniae y uno a Haemophilus influenzae.

Se obtuvo al menos una muestra para serología en 110 (93.2%) pacientes; en 92 (77.9%) pacientes la muestra fue doble; la serología proporcionó el diagnóstico microbiológico en 48/110 (43.6%) casos, tal como queda expuesto en la Tabla 4-7.

Microorganismo	n° de diagnósticos	n° de diagnósticos por seroconversión (% del total)	n° de diagnósticos por títulos elevados (% del total)
Chlamydia spp	21	18 (85.7%)	3 (14.3%)
Mycoplasma pneumoniae	19	15 (78.90%)	4 (21.1%)
virus Influenza A	6	1 (16.60%)	5 (83.4%)
Coxiella burnetii	2	0 (0%)	2 (100%)

Tabla 4-7 Casos con diagnóstico positivo por serología

Se practicó toracocentesis en 4 casos en los que el derrame pleural era lo suficientemente importante como para hacer imposible la localización de la condensación pulmonar para la práctica de la PTA. Se obtuvo el diagnóstico microbiológico en los 3 (75%) casos, 2 correspondían a Streptococcus pneumoniae y uno a Streptococcus pyogenes.

2.3. Resultados de la PTA

2.3.1. Generalidades

De los 118 pacientes incluidos en el estudio, 110 (93.2%) pudieron someterse a la PTA ([Figura 4-5](#)). De los 8 pacientes que no se sometieron a PTA, 4 (3.3%) presentaban derrame pleural lo suficientemente importante para hacer imposible la localización del infiltrado parenquimatoso, 4 (3.3%) padecían una situación clínica que no les permitía colaborar y 1 (0.8%) presentó paro respiratorio requiriendo intubación y ventilación mecánica.

2.3.2. Resultados de las tinciones y cultivos en la PTA

Se obtuvo un resultado positivo por cultivo de la PTA en 17 (15.4%) de las 110 PTA realizadas. Los microorganismos aislados quedan expuestos en la Tabla 4-8. De los 17 casos con cultivo positivo, 3 (17.6%) habían recibido tratamiento antibiótico previo, mientras que de los 20 casos con cultivo negativo (para gérmenes cultivables) 10 (50%) habían recibido tratamiento previo. La existencia de un tratamiento antibiótico con anterioridad a la realización de la PTA influyó de manera estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en los resultados de los cultivos.

Por otra parte, 10 pacientes con infección por SIDA y afectación radiológica intersticial fueron sometidos a tinción de metenamina de plata y Ziehl-Neelsen, siendo positivas en 3 (30%) y 0 (0%) casos, respectivamente.

Microorganismo	Número (% sobre el total de aislamientos)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	7 (41.1)
<i>Haemophilus influenzae</i>	6 (35.2)
<i>Streptococcus viridans</i>	1 (5.8)
<i>Enterococcus faecium</i>	1 (5.8)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1 (5.8)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1 (5.8)

Tabla 4-8 Microorganismos aislados por cultivo de la PTA

2.3.3. Resultados de la técnica de detección de antígenos bacterianos en la PTA

Se realizó determinación de antígenos de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* a 100 pacientes sometidos a PTA sin infección por VIH y afectación radiológica intersticial, y los resultados fueron positivos en 26/100 (26%) y 4/92 (4%) casos, respectivamente. De los 30 casos con resultado positivo para la detección de antígenos, 13 (43.3%) habían recibido tratamiento antibiótico previo; de los 3 casos con resultado negativo para la detección de antígenos (debiendo ser positivos), 1 (33.3%) había recibido tratamiento antibiótico previo. La existencia de un tratamiento antibiótico previo a la práctica de la PTA, no influyó, de forma estadísticamente significativa, en los resultados de los test de detección de antígenos de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*.

2.3.4. Resultados de la técnica de detección de genoma bacteriano por PCR

En 100 pacientes sin infección por VIH y afectación intersticial radiológica, se efectuó la PCR para la detección de genoma de *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae*, obteniendo resultados positivos en 15 (15%), 9 (9%) y 7 (7%) casos, respectivamente. Se realizó la PCR para la detección de genoma de *Legionella pneumophila* en 19 individuos con resultados negativos para todas las pruebas microbiológicas, y fue positiva en 0 (0%) casos. Asimismo, se efectuó la PCR para la detección de genoma de *Pneumocystis carinii* a 10 individuos con infección por VIH y afectación radiológica intersticial, siendo positiva en 6 (60%) casos (Tabla 4-9). No observamos ningún caso de amplificación de DNA para más de un microorganismo. De los 37 casos con PCR positiva, 16 (43.2%) habían recibido tratamiento antibiótico previo; de los 29 casos con PCR negativa (debiendo ser positiva), 10 (34.4%) habían recibido tratamiento previo. En consecuencia, la existencia de terapia antibiótica previa no influyó, de forma estadísticamente significativa, en los resultados de la PCR.

Microorganismo	n° de casos con PCR positiva/total de casos sometidos a la prueba
Streptococcus pneumoniae	15/100
Mycoplasma pneumoniae	9/100
Chlamydia pneumoniae	7/100
Legionella pneumophila	0/19
Pneumocystis carinii	6/10

Tabla 4-9 Resultados positivos para la PCR

2.3.5. Yatrogenia de la PTA

De los 110 pacientes con NAC sometidos a PTA, 14 (12.7%) sufrieron algún efecto no deseable derivado de la PTA. De éstos, 7 (6.3%) tuvieron un episodio de hemoptisis autolimitada, 4 (3.6%) se quejaron de dolor torácico, pero la aplicación de analgesia sólo fue necesaria en un caso, y 3 (2.7%) pacientes desarrollaron neumotórax -dos de ellos, con neumonía por Pneumocystis carinii-, aunque la colocación de tubo de drenaje pleural no fue necesaria por ser su tamaño inferior al 20% (Tabla 4-10). Tres pacientes fallecieron durante el estudio: el primero no se sometió a PTA; el segundo, tenía 81 años, neumonía por Streptococcus pneumoniae con insuficiencia respiratoria, y en la radiografía de control no se observó neumotórax tras la PTA; el tercero, era portador del virus de la infección por VIH, los resultados microbiológicos demostraron infección por Pneumocystis carinii y en la radiografía de control no se observó neumotórax.

Efecto	Número	Porcentaje
Hemoptisis	7	6.3%
Dolor torácico	4	3.6%
Neumotórax	3	2.7%

Tabla 4-10 Yatrogenia de la PTA

3. Estudio comparativo de los resultados de las diversas técnicas microbiológicas empleadas

3.1. Neumonía por Streptococcus pneumoniae

En nuestro estudio, 29 (24.5%) pacientes tuvieron infección por Streptococcus pneumoniae; además, en un caso, obtuvimos un resultado positivo para Chlamydia pneumoniae por serología, por lo que consideramos este caso como una infección mixta. De los 29 pacientes, 19 (65.5%) correspondían a varones y 10 (34.5%) a hembras; 11 (58.6%)

eran portadores de enfermedades crónicas (infección por VIH: 5, cáncer de pulmón: 5; EPOC: 3; hepatopatía alcohólica: 2, insuficiencia cardíaca: 1, demencia: 1); 14 (48.2%) habían recibido tratamiento antibiótico previo; 18 (62%) tenían un síndrome clínico considerado como típico; 11 (37.9%) presentaban insuficiencia respiratoria (ninguno requirió ventilación mecánica); La cifra media de leucocitos en sangre periférica era de 14.068/ mm₃ (rango: 2000-24500).

Dos pacientes presentaron derrame pleural con cultivos positivos a Streptococcus pneumoniae. Los 27 restantes se sometieron a PTA, cuyos resultados quedan expuestos en la Tabla 4-11.



Caso	Hemocultivo	PTA cultivo	PTA PCR	PrA detección de antígeno
1	+	+	+	+
2	-	-	+	+
3	-	+	+	+
4	-	-	+	+
5	-	-	+	+
6	-	+	+	+
7	-	+	+	+
8	-	-	-	+
9	-	-	-	+
10	-	-	-	+
11	-	-	+	+
12	-	-	-	+
13	+	-	-	+
14	+	+	+	+
15	+	-	-	+
16	-	-	-	+
17	-	-	-	+
18	-	-	+	+
19	-	-	-	+
20	+	-	+	+
21	+	-	+	+
22	-	-	+	+
23	-	-	-	+
24	+	+	+	+
25	+	-	-	-
26	+	-	-	+
27*	-	-	-	+

Tabla 4-11 Resultados microbiológicos de los 27 pacientes con NAC por Streptococcus pneumoniae, sometidos a PTA.

* Caso con serología positiva para infección por Chlamydia pneumoniae.

De los 27 pacientes con NAC por Streptococcus pneumoniae sometidos a PTA, el cultivo de la PTA fue positivo en 7 (25.9%) casos, los hemocultivos en 9 (33.3%), la PCR

demonstró la existencia de DNA neumocócico en 15 (55.5%) casos y la determinación de antígeno neumocócico fue positiva en 26 (96.2%) casos.

En 10 (34.4%) casos se dispuso de cultivo para la práctica de antibiograma: en 9/10 (90%) casos el neumococo era sensible a la penicilina (CMI<0'01 $\mu\text{g/ml}$), y en 1/10 (10%) se demostró una sensibilidad intermedia (CMI=0.1-2 $\mu\text{g/ml}$). Para la eritromicina, 1/10 (10%) neumococo fue resistente a la eritromicina. Todos los neumococos testados (100%) fueron sensibles al cotrimoxazol.

3.2. Neumonía por microorganismos del género Chlamydia

24 (20.3%) pacientes fueron diagnosticados de NAC por microorganismos del género Chlamydia. De éstos, 2 fueron considerados como portadores de una infección mixta: en un caso se aisló Streptococcus viridans en la muestra obtenida por PTA, y en otro, se obtuvo un resultado positivo para antígeno neumocócico en la muestra de parénquima pulmonar.

De los 24 pacientes con NAC por microorganismos del género Chlamydia, 17 (70.8%) correspondían a varones y 7 (29.2%) a hembras; la edad media era de 54.2 (rango: 29-83); 8 (33.3%) presentaban enfermedad crónica previa (EPOC: 4, diabetes: 1, infección por VIH: 1, insuficiencia cardíaca: 1, accidente cerebrovascular: 1); 5 (20.8%) habían recibido tratamiento antibiótico previo; 8 (33.3%) eran portadores de un síndrome clínico considerado típico; 11 (45.8%) se encontraban en insuficiencia respiratoria; la cifra media de leucocitos en sangre periférica era de 12050/mm₃ (rango:4100-27500); 14 (58.3%) requirieron ingreso hospitalario (uno en UCI); 12 (50%) recibieron tratamiento con macrólidos y 12 (50%) con β -lactámicos; los 24 (100%) evolucionaron favorablemente quedando afebriles en una media de 1.9 días (rango: 1-6); cuando se analizaron el grupo tratado con macrólidos y el grupo tratado con β -lactámicos con respecto a los días en que tardaron en quedar afebriles, no observamos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p= 0.40$).

Caso	PCR	Serología (P determinación)	Serología (2* determinación)	Otros diagnósticos	Diagnóstico definitivo
1		1/256	1/1024	-	M. pneumoniae
2		0	1/256	-	M. pneumoniae
3	+	1/128	1/512	-	M. pneumoniae
4		0	1/256	-	M. pneumoniae
5		1/256	1/1024	-	M. pneumoniae
6	+	0	1/256	-	M. pneumoniae
7	+	0	1/256	-	M. pneumoniae
8	+	1/256	1/1024	-	M. pneumoniae
9		0	1/256	-	M. pneumoniae
10		1/128	1/128	-	M. pneumoniae
11	NR	1/512	1/512	-	M. pneumoniae
12		0	1/256	-	M. pneumoniae
13	+	0	1/256	-	M. pneumoniae
14	+	1/256	1/1024	-	M. pneumoniae
15	+	1/128	1/512	-	M. pneumoniae
16	+	1/128	1/512	-	M. pneumoniae
17		0	1/128		M. pneumoniae
18		1/512	1/512	-	M. pneumoniae
19		1/512	NR	-	M. pneumoniae
20	+	NR	NR	-	M. pneumoniae

Tabla 4-13 Resultados de las diferentes técnicas microbiológicas en los pacientes con NAC por Mycoplasma pneumoniae.

Los resultados de los diferentes procedimientos microbiológicos quedan reflejados en la Tabla 4-14. De los 24 pacientes con infección por microorganismos del género Chlamydia, 11 tenían evidencia serológica de infección por Chlamydia pneumoniae y en 4/10 (40%) dicha evidencia fue confirmada por la técnica de PCR; 6 casos tuvieron serología positiva simultánea para Chlamydia pneumoniae y Chlamydia psitacci (con PCR negativa), considerándose esta situación como reacción cruzada, clasificando a los pacientes en esta situación como afectados de NAC por Chlamydia spp; 4 casos tuvieron serología positiva para Chlamydia psitacci (con PCR negativa).

Procedimiento	Casos positivos/casos totales	Porcentaje
hemocultivo	1/7	14%
detección de antígeno	4/6	66.6%
cultivo PTA	6/6	100%

Tabla 4-14 Resultados positivos en los pacientes con NAC por Haemophilus influenzae.

Por otra parte, en 3 ocasiones en que no se dispuso de muestras pareadas para serología, la PCR para Chlamydia pneumoniae fue positiva.

3.3. Neumonía por Mycoplasma pneumoniae

20 (16.9%) pacientes fueron diagnosticados de NAC por Mycoplasma pneumoniae. 9 (45%) correspondían a varones y 11 (55%) a hembras; tenían una edad media de 40 años (rango: 17-72); 8 (40%) padecían enfermedades crónicas (EPOC: 4, hepatopatía alcohólica: 2, diabetes: 1, insuficiencia cardiaca: 1); 11 (55%) habían recibido tratamiento antibiótico previo; 6 (30%) presentaban un síndrome clínico considerado como típico y 2 (10%) se encontraban en insuficiencia respiratoria; la cifra media de leucocitos en sangre periférica era de 10500/mm³ (rango: 4500-20300); 11 (55%) fueron ingresados en el hospital; 16 (80%) recibieron tratamiento con macrólidos y 4 (20%) con β -lactámicos; todos (100%) evolucionaron favorablemente, quedando afebriles en una media de 3.4 días (rango: 1-8). ([Tabla 4-13](#)).

De los 20 pacientes con infección por Mycoplasma pneumoniae, 19 fueron sometidos a PTA. La serología fue positiva en 19/19 (100%): 15 por seroconversión y 4 por títulos establemente elevados. La PCR fue positiva en 9/19 (47.3%) ([Tabla 4-13](#)).

3.4. Neumonía por Haemophilus influenzae

7 (5.9%) pacientes tuvieron infección causada por Haemophilus influenzae. Con una edad media de 45.8 años (rango: 27-79), 6 (85.7%) con enfermedad crónica previa (EPOC: 2, infección por VIH: 2, lupus eritematoso sistémico: 1, agranulocitosis: 1), 3 (42.8%) habían recibido tratamiento antibiótico previo, 2 (28.5%) se encontraban en insuficiencia respiratoria. Uno presentó paro respiratorio por lo que requirió intubación y ventilación mecánica en UCI. Un paciente falleció.

Los resultados de los diferentes métodos microbiológicos quedan expuestos en la Tabla 4-14. El hemocultivo fue positivo en 1/7 (14%), se detectó antígeno de Haemophilus influenzae en 4/6 (66.6%) y el cultivo de la PTA fue positivo en 6/6 (100%) casos. ([Tabla 4-14](#)).

3.5. Neumonía por Pneumocystis carinii

7 pacientes con infección por VIH tuvieron infección por Pneumocystis carinii.

En un caso, el cultivo de la PTA permitió hacer el diagnóstico de tuberculosis, por lo que consideramos este caso como infección mixta. Los resultados microbiológicos quedan expuestos en la Tabla 4-15. En el esputo, la tinción de metenamina de plata fue positiva en 3/6 (50%) y la PCR en 2/5 (40%). En la PTA, la tinción de metenamina de plata fue positiva

en 3/7 (42.8%) mientras que la PCR fue positiva en 6/7 (85.7%) casos.

Muestra	Tinción de plata casos positivos/casos totales (%)	PCR casos positivos/casos totales (%)
Esputo	3/6(50%)	2/5(40%)
PTA	3/7 (42.8%)	6/7(85.7)

Tabla 4-15 Resultados de las diferentes técnicas microbiológicas en pacientes con infección por Pneumocystis carinii.

3.6. Neumonía por otros microorganismos

Citamos en este capítulo aquellos microorganismos con menor importancia numérica tal y como muestran los resultados del estudio.

Seis (5%) pacientes tuvieron evidencia serológica de infección por el virus de la Influenza A. Con una edad media de 68.5 (rango: 46-82) años, 3 (50%) tenían enfermedad crónica subyacente y 3 (50%) se encontraban en situación de insuficiencia respiratoria.

Fueron diagnosticados de tuberculosis 3 (2.5%) pacientes con infección por VIH. En el esputo, la tinción de Ziehl-Neelsen fue positiva en 1/3 (33.3%) casos y el cultivo de micobacterias en 3/3 (100%). En la PTA, la tinción fue positiva en 0/3 (0%) casos y el cultivo en 1/3 (33.3%) casos.

Dos pacientes tuvieron evidencia serológica de infección por Coxiella burnetti. En ninguno de los dos casos pudo establecerse una relación epidemiológica con prácticas ganaderas. En ambos casos, la infección no se acompañó de insuficiencia respiratoria y los pacientes no requirieron ingreso hospitalario.

En un paciente con derrame pleural, el cultivo del material obtenido por toracocentesis permitió aislar Streptococcus pyogenes.

Los casos de infección por Streptococcus viridans, Enterococcus faecium y Criptococcus neoformans fueron diagnosticados por cultivo de la PTA. En los 3 casos, los hemocultivos resultaron negativos.

3.7. Visión global de los resultados de las diversas técnicas microbiológicas empleadas

Los resultados obtenidos de las diferentes técnicas microbiológicas empleadas en los principales microorganismos quedan globalmente resumidos en la Tabla 4-16.

	Hemocultivo	Serología	Punción transtorácica aspirativa		
			Antígeno	Cultivo	PCR
Streptococcus pneumoniae	9/29 (31%)	-	26/27 (96.2%)	7/27 (25.9%)	15/27 (55.5%)
Mycoplasma pneumoniae	-	19/19 (100%)			9/19 (47.3%)
Chlamydia pneumoniae	-	11/11 (100%)			7/12 (58.3%)
Haemophilus influenzae	1/7(14%)	-	4/6 (66.6%)	6/6 (100%)	7/13

Tabla 4-16 Resultados de los diferentes técnicas microbiológicas empleadas en los principales microorganismos responsables de NAC.

4. Cálculo de la eficacia diagnóstica de las nuevas técnicas microbiológicas

4.1. Eficacia diagnóstica de la determinación de antígenos bacterianos

Para la determinación de antígeno capsular de Streptococcus pneumoniae los resultados fueron los contenidos en la tabla siguiente:

Resultados	positivos	negativos
verdaderos	26	67
falsos	0	1

Sensibilidad 96.2%

Valor predictivo negativo 98.5%

Tabla 4-17

Para la determinación de antígeno de Haemophilus influenzae los resultados fueron los contenidos en la tabla siguiente:

Resultados	positivos	negativos
verdaderos	4	88
falsos	0	2

Sensibilidad 66.6%

Valor predictivo negativo 97.7%

Tabla 4-18

4.2. Eficacia diagnóstica de la PCR

Para el diagnóstico de infección por Streptococcus pneumoniae, los resultados fueron los contenidos en la tabla siguiente:

Resultados	positivos	negativos
verdaderos	15	67
falsos	0	12

Sensibilidad	55.5%
Valor predictivo negativo	84.8%

Tabla 4-19

Para el diagnóstico de infección por Chlamydia pneumoniae, los resultados fueron los contenidos en la tabla siguiente:

Resultados	positivos	negativos
verdaderos	15	67
falsos	0	12

Sensibilidad	55.5%
Valor predictivo negativo	84.8%

Tabla 4-20

Los resultados de la PCR para el diagnóstico de infección por Mycoplasma pneumoniae, fueron los contenidos en la tabla siguiente:

Resultados	positivos	negativos
verdaderos	9	88
falsos	0	10

Sensibilidad	47.3%
Valor predictivo negativo	89.7%

Tabla 4-21

Los resultados de la PCR en la PTA para el diagnóstico de infección por Pneumocystis carinii, fueron los contenidos en la tabla siguiente:

Resultados	positivos	negativos
verdaderos	6	4
falsos	0	1

Sensibilidad	85.7%
Valor predictivo negativo	80%

Tabla 4-22

En el esputo, los resultados de la PCR para el diagnóstico de infección por Pneumocystis carinii, fueron los siguientes: sensibilidad: 66.6%; valor predictivo negativo: 75%.

5. Aportación diagnóstica de los nuevos métodos de diagnóstico microbiológico a la PTA

Este estudio se ha realizado en base a aquellos casos con diagnóstico microbiológico que pudieron someterse a PTA. Estos casos suman un total de 94.

Por métodos de diagnóstico convencional, es decir, por cultivo y tinción del material obtenido por PTA, se diagnosticaron 19/94, lo cual da una sensibilidad a la técnica del 25.3%. (17.2%)

La introducción de las nuevas técnicas microbiológicas como la detección de antígenos y la PCR, ha permitido a la PTA realizar un total de 58 diagnósticos microbiológicos, lo cual determina una sensibilidad global a la técnica del 52.7% para el diagnóstico de NAC, incrementando la sensibilidad diagnóstica de la PTA en un 36.4% ([Figura 4-6](#)). Si analizamos por separado la influencia de cada uno de los métodos empleados obtendremos que, de los 39 nuevos diagnósticos, 20 (51.2%) fueron confirmados por la detección de antígenos bacterianos y 25 (64.1%) fueron confirmados por PCR.

6. Aportación diagnóstica de la PTA en el estudio etiológico de la NAC

De los 102 diagnósticos microbiológicos finales, 67 (65.6%) pudieron ser realizados por métodos convencionales de diagnóstico y 58 (56.8%) por PTA.

Ahora bien, consideramos como aportación diagnóstica de la PTA a aquellos casos diagnosticados mediante PTA y que no lo fueron mediante el empleo de los métodos convencionales.

Así, de los 102 diagnósticos microbiológicos realizados durante el estudio, 35 (34.4%) fueron diagnosticados exclusivamente por la PTA. La aportación diagnóstica de las diversas técnicas microbiológicas a la PTA fue la siguiente: Los métodos microbiológicos convencionales (tinciones y cultivo), añadieron 12/35 (34.2%) nuevos diagnósticos (Streptococcus pneumoniae: 3, Haemophilus influenzae: 6, Streptococcus viridans: 1, Enterococcus faecium: 1, Cryptococcus neoformans: 1). Las técnicas de detección de antígenos añadieron a los cultivos 15 (42.8%) nuevos diagnósticos (Streptococcus pneumoniae: 15); La PCR añadió a los cultivos y a la determinación de antígenos bacterianos 8 (22.8%) nuevos diagnósticos (Pneumocystis carinii: 4, Chlamydia pneumoniae: 3, Mycoplasma pneumoniae: 1) ([Figura 4-7](#)).

La aportación de la PTA vista desde el punto de vista de cada microorganismo, queda de la siguiente manera: De los 11 casos de infección por Streptococcus pneumoniae

diagnosticados por métodos convencionales de diagnóstico (MCD), la PTA confirmó 8 (72.7%) y añadió 18 nuevos casos. De los 11 casos de infección por Chlamydia pneumoniae diagnosticados por MCD, la PTA confirmó 4 (36.6%) y añadió 3 nuevos casos. De los 19 casos de infección por Mycoplasma pneumoniae diagnosticados por MCD, la PTA confirmó 8 (42.1%) y añadió 1 nuevo caso. La PTA no confirmó un caso de infección por Haemophilus influenzae diagnosticado por MCD, pero añadió 6 nuevos casos. De los 3 casos de infección por Pneumocystis carinii diagnosticados por MCD, la PTA confirmó 2 (66.6%) y añadió 4 nuevos casos. De los 3 casos de infección por Mycobacterium tuberculosis diagnosticados por MCD, la PTA confirmó 1 (33.3%). La PTA añadió, por otro lado, 3 nuevos microorganismos no diagnosticados por MCD: Streptococcus viridans, Enterococcus faecium y Cryptococcus neoformans (Tabla 4-23)

Microorganismo	n° diagnósticos por MCD*/confirmados por PTA(%)	n° diagnósticos exclusivamente por PTA (% del total de casos del microorganismo)
Streptococcus pneumoniae	11/8 (72.7%)	18 (62%)
Chlamydia pneumoniae	11/4 (36.6%)	3 (27.2%)
Chlamydia spp	6/0 (0%)	0
Chlamydia psittaci	4/0 (0%)	0
Mycoplasma pneumoniae	19/8 (42.1%)	1 (5.2%)
Hemophilus influenzae	1/0 (0%)	6 (85.7)
Pntumocystis carinfl	3/2 (66.6%)	4 (57.1%)
Mycobacterium tuberculosis	3/1 (33.3%)	0 (0%)
Influenza A virus	6/0 (0%)	0
Coxiella burnetti	2/0 (0%)	0
Streptococcus pyogenes	1/0 (0%)	0
Streptococcus viridans	0/0 (0%)	1 (100%)
Enterococcus faecium	0/0(0/0)	1 (100%)
Cryptococcus neoformans	0/0 (0%)	1 (100%)
TOTAL: 102 (100%)	67 (65.6%)	35(34.4%)

Tabla 4-23 Relación de microorganismos diagnosticados por métodos convencionales de diagnóstico que fueron confirmados por PTA, y casos diagnosticados exclusivamente por PTA. MCD: métodos convencionales de diagnóstico.

La aportación de las nuevas técnicas microbiológicas al diagnóstico de nuevos casos por PTA, fue la siguiente: De los 18 nuevos casos de infección por Streptococcus pneumoniae diagnosticados por PTA, 6 (33.3%) casos fueron aislados por cultivo, en 8 (44.4%) casos se detectó DNA bacteriano por PCR, y en los 18 (100%) casos, la detección de antígeno bacteriano fue positiva. De los 6 nuevos casos de infección por Haemophilus influenzae diagnosticados por PTA, 6 (100%) fueron diagnosticados por cultivo y 4 (66.6%)

por detección de antígeno bacteriano. De los 4 nuevos casos de infección por Pneumocystis carinii diagnosticados por PTA, 1 (25%) fue positivo para la tinción de metenamina de plata y los 4 (100%) obtuvieron resultados positivos para la PCR (Tabla 4-24).

Microorganismo	Nuevos diagnósticos por PTA	n° casos diagnosticados por cultivo/tinción de plata (%*)	n° casos diagnosticados por detección de antígeno (%*)	n° casos diagnosticados por PCR (%*)
Streptococcus pneumoniae	18	6(33.3%)	18(100%)	8(44.4%)
Haemophilus influenzae	6	6(100%)	4(66.6%)	-
Pneumocystis carinii	4	1 (25%)	-	4(100%)

Tabla 4-24 Aportación de las nuevas técnicas microbiológicas a los casos diagnosticados exclusivamente por PTA.

*: % del total de nuevos casos diagnosticados.

BIBLIOTECA VIRTUAL



E) Discusión

1. Características generales del estudio

Durante 15 meses hemos tenido la oportunidad de analizar las características clínicas y microbiológicas de 118 individuos con NAC que fueron atendidos en el área de urgencias de nuestro hospital, considerado como el centro de referencia de la comunidad de Lleida.

No hemos adoptado medidas restrictivas en cuanto a selección de pacientes por su patología de base se refiere. Incomprensiblemente, algunos autores excluyen a los pacientes con infección por VIH de los estudios sobre NAC cuando, además de padecer infecciones oportunistas, esta población está predispuesta a infecciones por gérmenes convencionales (Marrie, 1995). Así, el 15.2% de nuestra población en estudio padecía infección por VIH, constituyendo la enfermedad crónica de base más frecuente y, el 44.4% de estos enfermos estaban infectados por gérmenes considerados como convencionales (Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Chlamydia pneumoniae). Creemos que el prejuicio de algunos clínicos a considerar sólo los gérmenes oportunistas como potenciales patógenos en individuos con infección por VIH, puede conducir a errores graves en la terapia elegida como, por ejemplo, tratar una neumonía por Chlamydia pneumoniae con tuberculostáticos.

La insuficiente ayuda proporcionada por los métodos convencionales de diagnóstico microbiológico para conocer la etiología de la NAC, nos ha animado a incluir en nuestro estudio nuevas técnicas con el fin de incrementar el porcentaje de casos etiológicamente filiados.

Así, en cuanto a las técnicas de obtención de muestras, nos hemos inclinado por la PTA como técnica invasiva de obtención de muestras no contaminadas procedentes del foco inflamatorio pulmonar. A diferencia de otros estudios que han utilizado la PTA como técnica invasiva de obtención de muestras en un grupo seleccionado de enfermos -los más graves, desde el punto de vista clínico-, el nuestro no ha sido restrictivo en este sentido, sometiendo a PTA a todos los individuos con NAC (quedando excluidos aquellos con contraindicaciones absolutas para la técnica, obviamente). De esta forma, hemos tenido la oportunidad de conocer el grado de aplicabilidad, rendimiento y los efectos adversos de la PTA en la población general con NAC.

En cuanto a los métodos de procesamiento de las muestras obtenidas conviene hacer referencia a dos puntos. En primer lugar, y a diferencia de la mayoría de estudios epidemiológicos anteriores, hemos sido estrictos en los criterios de especificidad de los resultados del cultivo de esputo, considerando como verdaderos positivos sólo a los patógenos obligados (en nuestro caso, Legionella pneumophila, Mycobacterium tuberculosis y Pneumocystis carinii). En cuanto a las técnicas serológicas, hemos empleado la técnica de inmunofluorescencia para la detección de anticuerpos frente a Mycoplasma pneumoniae, técnica que ha mostrado con anterioridad una mayor sensibilidad que las técnicas de fijación del complemento y ELISA (Lee et al, 1989), y la técnica de microinmunofluorescencia, considerada como la más sensible para la detección de anticuerpos frente a Chlamydia pneumoniae; sin embargo, hemos obviado en ésta última, la detección de anticuerpos tipo Ig M, técnica poco sensible para casos de reinfección y con problemas de especificidad (Ekman et al, 1993). En segundo lugar, hemos añadido nuevas técnicas microbiológicas a la batería de las ya utilizadas habitualmente.

Así, la detección de antígenos bacterianos en suero y orina, aprobada como criterio de seguridad diagnóstica (Research Committee of British Thoracic Society and Public Health Laboratory Service, 1987) y utilizada en diversos estudios epidemiológicos (Tabla 1-13) ha sido escasamente valorada cuando se emplean técnicas invasivas. De la misma manera, la técnica de detección de genoma bacteriano mediante PCR, ha sido validada para su

utilización en muestras de esputo, frotis faringeo, suero, sangre y, en un escaso número de ocasiones, en muestras obtenidas por broncoscopia ([Tabla 1-14](#)). Hasta la fecha, no tenemos información de que la PCR haya sido utilizada en muestras obtenidas por PTA (Medline: 1990-1995).

En consecuencia, nuestro estudio ha sido diseñado con el fin de ampliar los conocimientos ya obtenidos sobre la detección de antígenos bacterianos y aportar los primeros datos sobre el comportamiento de la PCR en muestras obtenidas por PTA.

La introducción de las técnicas anteriormente citadas ha sido beneficioso para alcanzar nuestro objetivo. Tan sólo 19 (16.2%) casos han quedado sin filiar etiológicamente en nuestro estudio. Si comparamos nuestros resultados con los obtenidos en estudios anteriores -media de casos sin diagnóstico: 46.7% (rango= 28-65.8%) ([Tabla 1-2](#))- observamos una reducción significativa en la cifra de casos no filiados en torno al 30%.

Algunos autores, por otro lado, se inclinan por utilizar estrictos criterios no considerando el cultivo de esputo como técnica diagnóstica. Así, y a pesar de reducir su porcentaje de casos diagnosticados, consideran sus resultados más fiables. Es el caso de Bates y colaboradores (1992), que diagnostican aproximadamente la mitad de casos y no incluyen el cultivo de esputo como criterio diagnóstico. Así, los microorganismos del género *Legionella* son los protagonistas de la NAC en su estudio. Pero esta actuación podría introducir un sesgo que modificaría los verdaderos resultados considerando protagonistas de la NAC a microorganismos cuyos resultados están basados fundamentalmente en técnicas serológicas, técnicas consideradas más sensibles que el hemocultivo, el cual constituye el único método para diagnosticar NAC por *Streptococcus pneumoniae*, quedando relegado éste último, a puestos de menor importancia. Así, en nuestro estudio, los métodos convencionales de diagnóstico apuntaron a *Mycoplasma pneumoniae* y microorganismos del género *Chlamydia* como protagonistas de NAC en nuestro medio, mientras que la introducción de la PTA permitió situar al *Streptococcus pneumoniae* en el primer lugar de los microorganismos. Consideramos este hecho, de considerables implicaciones terapéuticas en el manejo diario de la NAC, insuficientemente valorado con anterioridad.

Los criterios clásicos de tipicidad o atipicidad en el diagnóstico clínico, han mostrado un escaso valor predictivo, corroborando los resultados de estudios previos (Farr et al, 1989). Así, cumplían criterios de neumonía clínicamente típica el 62% de los individuos con infección por *Streptococcus pneumoniae*, mientras que el 70% y el 66.6% de los casos de infección por *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae* respectivamente, cumplían criterios de neumonía clínicamente atípica. Sin embargo, lejos de ser un criterio a abandonar (Fang et al, 1990), consideramos el reconocimiento de las características clínicas del enfermo como orientativo en el manejo diario de la NAC.

Los métodos convencionales de diagnóstico, aunque de manera desigual, han contribuido al diagnóstico microbiológico en el 65.6% de los casos. Obtuvimos resultados positivos de las tinciones-cultivos de esputo, los hemocultivos y la serología en 10.2%, 8.4% y 43.6%, respectivamente. El hemocultivo fue la técnica convencional más aplicable obteniéndose muestra en el 100% de los casos. El cultivo-tinción del esputo fue la menos aplicable, puesto que sólo el 41.5% de los individuos expectoraban. En el 93.2% de los casos se dispuso de una primera muestra para serología, y en el 77.9% de los casos, de dos muestras (con 4 semanas de diferencia entre una y otra). Este hecho aporta, de manera indirecta, una cifra a cerca del correcto seguimiento clínico-radiológico de los individuos incluidos en el estudio.

2. Características de la NAC de Lleida

2.1. Generalidades

La edad media de los individuos incluidos en nuestro estudio fue de 51.3 años, cifra similar a la obtenida en anteriores estudios (Antela et al, 1993), con un amplio margen de edades comprendidas entre 15 y 87 años y un 38% de los casos con edades superiores a los 65 años. El relativamente bajo número de individuos con enfermedades crónicas subyacentes (40.6%) ha podido condicionar el porcentaje obtenido de ingresos hospitalarios (65.2%), cifra sensiblemente inferior a la obtenida por series previas, donde el alto porcentaje de enfermedades previas condicionó un 91% de ingresos hospitalarios (Blanquer et al, 1991). Una mortalidad del 2.5% resulta considerablemente inferior a la obtenida en estudios previos ([Tabla 1-1](#)).

2.2. Microorganismos implicados en la NAC de Lleida

Son tres los microorganismos implicados con mayor frecuencia en la NAC en Lleida: Streptococcus pneumoniae, microorganismos del género Chlamydia y Mycoplasma pneumoniae. Este grupo, por sí sólo, constituye el 73.7% del total de microorganismos aislados.

Sin embargo, si centramos la atención sobre sectores concretos de población, la situación cambia ligeramente. Así, entre los individuos con edad inferior a 65 años sin enfermedades crónicas de base, los microorganismos más comúnmente implicados son, por este orden, Mycoplasma pneumoniae, microorganismos del género Chlamydia y Streptococcus pneumoniae. Los gérmenes considerados como atípicos constituyen el 79.4% del total de microorganismos aislados en este grupo de población. Sin embargo, entre los individuos con edad superior a los 65 años, los microorganismos implicados con mayor frecuencia son, por este orden, Streptococcus pneumoniae, microorganismos del género Chlamydia y el virus de la Influenza A. Los microorganismos considerados como atípicos fueron causantes del 40% del total de microorganismos aislados en este grupo de población. Nuestros resultados en este grupo poblacional se asemejan a los obtenidos por Venkatesan y colaboradores (1990), los cuales aceptan como microorganismos más frecuentes Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae y Virus de la Influenza B. Estos autores -al igual que nuestra serie- no encuentran evidencia de infección por bacilos gramnegativos, a diferencia de los hallazgos de Ebright y Rytel (1980), donde el 21.2% de las infecciones en individuos ancianos con enfermedad de base grave, estaban causadas por estos microorganismos. Estudios en ancianos debilitados por enfermedades crónicas y NAC grave utilizando la punción transtraqueal aspirativa, han mostrado una alta incidencia de infección por bacilos gramnegativos (Verghese y Berck, 1983). La situación de debilidad extrema podría conducir a la aspiración de microorganismos de la orofaringe; Sin embargo, su hallazgo en cultivos de esputo de individuos ancianos sin enfermedades de base y autónomos desde el punto de vista funcional, traducirían un estado de contaminante en lugar de patógeno (Valenti, 1978). En nuestro análisis, el 85.3% de los ancianos procedían de su propio domicilio -83% en el estudio de Venkatesan (1990)-, lo cual aporta una idea del correcto estado de salud previo de los ancianos estudiados.

Nuestros resultados no se alejan de los proporcionados por estudios previos, donde el Streptococcus pneumoniae encabeza la lista de los microorganismos implicados en la NAC ([Tabla 1-2](#)). En nuestro caso, el neumococo fue el protagonista de, aproximadamente, el 25% de todos los casos. Su importancia en los diferentes estudios depende de lo estricto que se sea para considerarlo agente causal. Así, el neumococo fue causante del 5% de los casos cuando no se consideró el esputo como muestra aceptable (Bates et al, 1992), y del 46% cuando el esputo encontró un espacio entre las muestras a estudiar (Örtqvist, 1990). La elevada

proporción de individuos con infección por Streptococcus pneumoniae y enfermedades crónicas (45%) sugiere una predisposición de estos enfermos a la infección neumocócica, hecho citado con anterioridad (Gaztelorrutia, 1994). Además, algo más de la mitad de los enfermos tenían una edad superior a los 65 años, predisposición ya conocida en estudios previos (Espósito, 1984). El 31% de los casos fueron bacteriémicos, pero no se logró demostrar una mayor mortalidad entre los individuos con hemocultivos positivos, puesto que sólo falleció un (3.4%) paciente y el hemocultivo resultó negativo. Escasa información puede obtenerse en referencia a la susceptibilidad antibiótica, puesto que en el 59% de los casos el diagnóstico de infección neumocócica se basó en las técnicas de detección de antígenos o PCR, las cuales no permiten el empleo de antibiogramas. Del escaso número de antibiogramas realizados -10- obtuvimos unos niveles de resistencia antibiótica a la penicilina y eritromicina del 10%, niveles sensiblemente inferiores a los obtenidos en otras áreas de nuestro país (Bouza, 1993), probable consecuencia de una menor presión antibiótica en nuestro ámbito. Con estos resultados, y centrando nuestra atención sobre los enfermos con infección por VIH, los resultados microbiológicos nos hubieran permitido tratar correctamente al 55.5% de los casos con cotrimoxazol.

Mycoplasma pneumoniae ocupó el segundo lugar de los protagonistas de NAC en nuestra comunidad, con el 16.9% del total de individuos incluidos en el estudio. Este porcentaje coincide con la mayoría de estudios previos que sitúan el protagonismo de Mycoplasma pneumoniae entre el 15-30% de los casos (Research committee of British Thoracic Society and Public Health Laboratory Service, 1987). El escaso protagonismo del Mycoplasma pneumoniae en otros exhaustivos trabajos (Korppi et al, 1993) no haría sino traducir una predisposición del microorganismo a generar infección en forma de epidemias (cada 3-4 años, aproximadamente), hecho ya conocido con anterioridad (Manresa y Dorca, 1994). Otro hecho que puede modificar el diferente protagonismo del Mycoplasma pneumoniae es la técnica serológica empleada. Es un hecho comprobado que la técnica de ELISA para el diagnóstico de infección por Mycoplasma pneumoniae tiene una sensibilidad y especificidad superiores a la de fijación de complemento (Dussaix et al, 1983); y que la inmunofluorescencia supera a las dos anteriores (Sin Hang Lee et al, 1989). Ejemplo de lo anteriormente citado es un reciente estudio de características similares al nuestro, en el que 33 pacientes seroconvirtieron por ELISA, mientras que sólo 3 lo hicieron por fijación del complemento (Antela et al, 1993). Por otra parte, en nuestra serie Mycoplasma pneumoniae constituyó el microorganismo protagonista de la NAC en individuos jóvenes sin patología de base, contabilizando cerca del 40% del total de casos diagnosticados en este grupo de población. Mycoplasma pneumoniae afectó al 10% de los ancianos, porcentaje similar al obtenido por Marrie (1993). La mayoría de los enfermos presentaba una neumonía bien tolerada, encontrándose sólo el 10% en insuficiencia respiratoria.

Chlamydia pneumoniae se consolida como agente principal en la NAC, con el 13.5% del total de enfermos estudiados, porcentaje similar al obtenido por Almirall et al (1993) en un área cercana a la nuestra y sensiblemente superior a la obtenida por Antela y colaboradores en otra zona del país (1993). Aunque se tiende a considerar la infección por Chlamydia pneumoniae de similares características a la producida por Mycoplasma pneumoniae, los resultados de nuestro estudio ofrecen una opinión diferente. El 50% de los casos afectaban a individuos con edad superior a los 60 años; este resultado se acerca al obtenido por Grayston (1992), el cual observó una incidencia bimodal de afectación por edades, una a los 9 años, la otra en torno a los 70 años. A diferencia de los infectados por Mycoplasma pneumoniae, el 42.8% se encontraban en situación de insuficiencia respiratoria y uno de ellos requirió ventilación mecánica en UCI. La co-infección con otros patógenos no

es una situación infrecuente, habiéndose encontrado hasta en el 44% de los casos (Almirall et al, 1993). Nuestros resultados ofrecen datos de co-infección en 2 casos con serología positiva para las dos especies de Chlamydia: En uno de ellos, el cultivo de la PTA permitió aislar un Streptococcus viridans y, en otro, la determinación de antígeno capsular de neumococo en la PTA resultó positiva, considerando ambas situaciones como una infección mixta.

El escaso protagonismo que Haemophilus influenzae ha tenido en nuestro estudio es, con toda probabilidad, consecuencia del escaso porcentaje de individuos con EPOC previa (9.3%), a diferencia de otros estudios donde la elevada proporción de individuos con EPOC (31%) condicionó la presencia de este microorganismo como segundo agente causante de NAC (Fang, 1990). El 5.9% de las NAC en nuestro ámbito fueron atribuidas a infección por Haemophilus influenzae. Una paciente presentó paro respiratorio requiriendo ventilación mecánica en UCI, falleciendo posteriormente. A pesar de no disponer de un serotipado del microorganismo - la virulencia del germen es mayor cuando disponen de cápsula (Weller et al, 1978)-, consideramos que la evolución fatal de este caso estuvo relacionada con la situación inmunitaria de la paciente: presentaba una agranulocitosis por fármacos.

Tuvimos evidencia de seroconversión para el virus de la Influenza A en el 5% de nuestros pacientes con NAC. En la mayoría de los estudios realizados el porcentaje de neumonías víricas no supera el 10% del total de casos, afecta a los más jóvenes y puede dar lugar a compromiso respiratorio en individuos con enfermedades crónicas (Kauffman, 1994). En nuestro estudio, sin embargo, el 66.6% de los casos afectaron a enfermos con edad superior a los 65 años. El 50% de los pacientes se encontraba en insuficiencia respiratoria, de los cuales el 100% padecían alguna enfermedad crónica previa.

No hemos tenido evidencia serológica ni por cultivos de infección por Legionella pneumophila. La exhaustiva búsqueda realizada nos llevó, de manera retrospectiva, a practicar la técnica de la PCR en las muestras de PTA de los 19 individuos sin diagnóstico microbiológico definitivo, siendo los resultados negativos en todos los casos. Estos resultados confirmarían la aptitud geográfica de Legionella pneumophila por territorios costeros (Télez et al, 1990).

La infección por Coxiella burnetti afectó al 1.9% de nuestra población, porcentaje semejante al obtenido en otros estudios en nuestro país (Antela et al, 1993), pero no tan frecuente como en el país Vasco donde las prácticas ganaderas constituyen un sector de actividad laboral importante (Sobradillo et al, 1989).

El cultivo del material obtenido por toracocentesis en un paciente con derrame pleural, así como el obtenido por cultivo del material obtenido por PTA, nos permitieron aislar Streptococcus pyogenes y Streptococcus viridans respectivamente, microorganismos aislados con diferente asiduidad entre pacientes con NAC (Farr y Mandell, 1994). Más excepcional es el hallazgo de Enterococcus faecium en un cultivo de PTA. La neumonía por enterococo es excepcional y sólo se han descrito algunos casos de adquisición nosocomial en pacientes ancianos, con enfermedad debilitante o sometidos a tratamientos antibióticos de amplio espectro (Berck et al, 1983). En nuestro caso, se trataba de un paciente anciano, sin enfermedad de base conocida y no había sido sometido a tratamiento previo alguno. Aunque Enterococcus faecium puede producir enfermedad en el ser humano (Musher, 1990), hasta la fecha sólo tenemos conocimiento un caso más de NAC por este microorganismo (Molinos et al, 1995)(Medline, 1990-1995).

Aproximadamente, el 15% de nuestra población estaba constituido por pacientes con infección por VIH. Los diagnósticos microbiológicos obtenidos en esta población presentan una distribución similar a la obtenida en otras series que emplean la broncoscopia como técnica diagnóstica invasiva (Mínguez, 1993). Entre las infecciones oportunistas, La

neumonía por **Pneumocystis carinii** ocurrió con mayor frecuencia (64%), hegemonía constatada por numerosos estudios y a pesar de las efectivas campañas de profilaxis realizadas (Chien et al, 1992). Entre las bacterianas, **Streptococcus pneumoniae** fue el protagonista del 70% de los episodios, protagonismo conocido ya con anterioridad (Miller y Mitchell, 1995). Dos recientes estudios han comunicado 8 casos de infección por **Pneumocystis carinii** con estudios de inmunidad repetidamente normales (Jaccobs et al, 1991 y Cano et al, 1993). Sin embargo, cuidadosos estudios post-mortem sobre tejido pulmonar de individuos sanos, no han servido para demostrar colonización por **Pneumocystis carinii** (Peters et al, 1991). Por ello, y dado lo excepcional de los casos comunicados, nuestra investigación sobre **Pneumocystis carinii** se ha centrado sobre individuos con infección por VIH. La posibilidad de encontrar infecciones mixtas no es algo excepcional (Miller et al, 1994) y en nuestro estudio tuvimos la oportunidad de diagnosticar una: El material obtenido de la PTA fue positivo para **Pneumocystis carinii** por PCR y permitió aislar **Mycobacterium tuberculosis** por cultivo. Por último, la afectación pulmonar por **Cryptococcus neoformans** no se considera una situación extraordinaria, llegando en algunas series a protagonizar el 45% de todos los casos de infección pulmonar en pacientes con infección por VIH (Wasser y Talavera, 1987). Aunque en la mayoría de los casos la afectación pulmonar constituye una manifestación más en el contexto de una criptococosis diseminada (Martos et al, 1992), tuvimos la oportunidad de aislar este microorganismo por PTA sin evidencia de afectación de otro órgano de la economía.

3. Valoración de los resultados obtenidos con los nuevos métodos microbiológicos

3.1. Valoración de los resultados de los métodos de detección de antígenos bacterianos

La eficacia que mostraron el cultivo de la PTA, el hemocultivo, la PCR y la detección de antígeno neumocócico en el diagnóstico infección por **Streptococcus pneumoniae** en los 27 pacientes sometidos a todas las técnicas fue, respectivamente del 25.9%, 33.3%, 55.5% y 92.6%; de tal forma que, en nuestra serie, la detección de antígeno neumocócico aparece como el test más sensible para el diagnóstico de infección por **Streptococcus pneumoniae**.

Nuestros resultados se asemejan a los aportados por Bella y colaboradores (1993), que utilizando el mismo test en muestras obtenidas por PTA en un tamaño poblacional sensiblemente inferior (n= 23), detectaron antígeno neumocócico en el 83.3% de los pacientes con NAC por **Streptococcus pneumoniae**.

La detección de antígeno neumocócico ha sido utilizada en otro estudio en el que el BAL por broncoscopia se ha empleado como técnica diagnóstica invasiva en el manejo de pacientes con NAC, siendo el único criterio diagnóstico - además del hemocultivo-, el cultivo cuantitativo del BAL ($>10^3$ UFC/ml) (Jiménez et al, 1994). Así, la detección de antígeno neumocócico confirmó el 54% de las infecciones por **Streptococcus pneumoniae** y fue positiva en el 53% de los casos con infección de origen no confirmado. Desde este punto de vista restrictivo, en nuestro estudio la detección de antígeno neumocócico habría confirmado el 91.6% de las infecciones neumocócicas y habría sido positiva en el 44.1% de los casos con infección no confirmada por cultivos. Desde este punto de vista, la determinación de antígeno neumocócico en muestras obtenidas por PTA resulta más eficaz que su determinación en muestras obtenidas por broncoscopia.

Resultados similares a los nuestros se han obtenido en algunos estudios donde el esputo constituye la muestra donde se realiza la determinación de antígeno neumocócico (Boersma et al, 1991). Sin embargo, la posibilidad de que sus resultados traduzcan un estado de portador por parte de **Streptococcus pneumoniae**, no permiten depositar toda la confianza

en esta muestra (Venkatesan y Macfarlane, 1992). Nuestros resultados no ofrecen la posibilidad de considerar falsos positivos de la técnica: En los 58 casos con diagnóstico microbiológico y detección de antígeno practicada, el resultado fue negativo en 57 casos. En uno, los resultados de la serología para ambas especies de *Chlamydia* resultó positiva, y el paciente evolucionó favorablemente tras la administración de penicilina, habiendo considerado este caso como infección mixta y no como un resultado falso positivo. Similares resultados han obtenido Esteban y colaboradores (1992), que someten 61 pacientes con NAC grave a PTA y determinación de antígeno neumocócico: ningún paciente con diagnóstico diferente de infección neumocócica obtuvo un resultado positivo para dicha técnica. Tampoco Jiménez y colaboradores (1994), encuentran en su serie evidencia de resultados positivos falsos, serie que incluye pacientes sin infección pulmonar como controles negativos.

Una eficacia del 88% obtenida en la determinación de antígeno neumocócico en muestras obtenidas por toracocentesis (Boersma et al, 1993), queda ensombrecida por la escasez de ocasiones en que esta muestra se encuentra disponible para estudio. Sin embargo, una muestra obtenida por PTA pudo obtenerse, en nuestro estudio, en 93.2% de los pacientes con NAC no seleccionados.

Los resultados de la determinación de antígeno neumocócico en muestras de orina o suero, con una sensibilidad en torno al 50% (Tabla 1-13), no superan las ventajas obtenidas por su determinación en muestras de PTA.

Por otro lado, los resultados de la determinación de antígeno capsular de *Haemophilus influenzae* aportaron una sensibilidad a la técnica del 66.6%. La comparación con otros resultados resulta difícil, puesto que en la serie de Bella et al (1993) se diagnosticaron tan sólo 2 casos de infección por *H. influenzae*: en el primero, los cultivos fueron positivos con determinación de antígeno negativa; en el segundo, los cultivos fueron negativos y la determinación de antígeno positiva (por la tinción de gram se observaron cocobacilos gramnegativos). Por tanto, si consideramos la tinción como criterio diagnóstico, la sensibilidad de la técnica en la serie de Bella y colaboradores (1993) resultó ser del 50%. En cualquier caso, estos resultados ofrecen una sensibilidad inferior a otras series que utilizan muestras de orina o suero, con una eficacia del 100% y 92%, respectivamente (Ajello et al, 1987). En cuanto a la especificidad, no tuvimos evidencia de resultados falsos positivos, al igual que Bella y colaboradores (1993). Sin embargo, en muestras de orina y suero, la especificidad de la determinación de antígeno de *H. influenzae* ha sido del 96%, inferior a la obtenida por nuestra serie (Ajello et al, 1987).

Por último, los resultados ofrecidos por nuestra serie invitan a pensar que estas técnicas no modifican sus resultados por la existencia de tratamientos antibióticos previos, como Holloway y colaboradores (1993) ya han demostrado in vitro: la técnica de aglutinación con látex es capaz de detectar 10^6 neumococos/ml con independencia de la adición o no de penicilina tras 72 horas de duración del experimento. El alto porcentaje de pacientes incluidos en estudios de NAC que han recibido tratamiento antibiótico previo -en nuestra serie el 40%, aproximadamente- dificulta enormemente la eficacia de los métodos tradicionales basados en el cultivo de muestras, y obliga a pensar en la introducción de técnicas cuyos resultados no se vean modificados por la existencia de terapias previas.

3.2. Valoración de los resultados obtenidos por PCR

La eficacia con que la PCR detectó genoma de *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* y *Pneumocystis carinii* en muestras obtenidas por PTA fue, respectivamente del 55.5%, 47.3%, 58.3% y 85.7%.

En muestras de sangre y suero de pacientes con neumonía bacteriémica por Streptococcus pneumoniae, la PCR ha sido eficaz entre el 63% y el 100% de los casos, dependiendo de la muestra estudiada y del fragmento de DNA utilizado para su amplificación. Parece ser más sensible amplificar el gen que codifica la Pneumolysina que el de la Autolysina (Rudolph et al, 1993). En nuestro estudio, hemos amplificado el gen PBP 2X, que codifica la síntesis de proteínas de adhesión a la penicilina, utilizado con anterioridad para estudios de resistencia antibiótica (Muñoz et al, 1991). La menor eficacia de la PCR para detectar Streptococcus pneumoniae en muestras de parénquima pulmonar puede atribuirse a una menor sensibilidad del gen amplificado o a la existencia de inhibidores de la polimerasa en la muestra, insuficientemente inactivados durante la extracción de DNA. Es bien conocido el poder inhibitor del grupo HEM (Higuchi, 1989), y la muestra obtenida por PTA suele obtener gran cantidad de sangre. Los estudios de sensibilidad realizados en nuestra serie, en los que la PCR fue positiva en muestras de PTA que contenían 5 UFC/ml y negativa en muestras con 11 UFC/ml, indicando, con toda probabilidad, una insuficiente inactivación de los inhibidores de la polimerasa en esta última muestra, apoyarían esta tesis. En cualquier caso, el escaso porcentaje de casos bacteriémicos -en nuestro estudio, el 31%-, hace más eficaz en la actualidad, la detección de genoma bacteriano en muestras obtenidas por PTA que en sangre. Son necesarios estudios para valorar la eficacia de la PCR en muestras de sangre de enfermos con NAC y hemocultivos negativos (Hassan-King et al, 1994). La sensibilidad demostrada en la detección de genoma neumocócico en muestras de esputo en una serie, del 92.8% (Gillespie et al, 1994), queda ensombrecida por la dudosa especificidad de sus resultados. Además, el escaso número de ocasiones en que el esputo se encuentra disponible para estudio -en nuestra serie, 41.5% de la población-, no permite depositar nuestra confianza en la utilización de la PCR en estas muestras. Finalmente, la PCR confirmó el 100% de los cultivos de la PTA pero no aportó ningún diagnóstico nuevo que no fuera confirmado por la técnica de detección de antígeno.

La PCR logró confirmar el 47.3% de los casos de infección por Mycoplasma pneumoniae. Tan sólo aportó un diagnóstico nuevo en un enfermo sin muestras de suero disponibles para estudio. La PCR aplicada sobre otras muestras clínicas ha demostrado una sensibilidad del 73-90% en diversas series (Tabla 1-14). Sin embargo, mientras que la especificidad parece excelente en estudios experimentales, se han observado resultados positivos en enfermos con serología negativa, incluso en individuos asintomáticos (Lüneberg et al, 1993). Estos hallazgos podrían atribuirse a la existencia de portadores asintomáticos en orofaringe, situación que podría ser evitada con la determinación de la PCR en muestras obtenidas por PTA. La escasa sensibilidad de la PCR obtenida en nuestra serie, podría ser debida a la escasa sensibilidad de la secuencia génica empleada. Sin embargo, la eficacia de los primers utilizados -MP5-1 y MP5-2-, ya ha sido extensamente evaluada con anterioridad (Bernet et al, 1989), con una especificidad demostrada al no haberse observado reacciones cruzadas con otros miembros de la misma especie ni con otros patógenos responsables de infecciones respiratorias. También, la escasa sensibilidad de la PCR podría ser debida a un fallo de la técnica de la PTA, no habiéndose conseguido muestras pulmonares no infectadas o existiendo en éstas, inhibidores de la polimerasa (Higuchi, 1989). Por último, la serología podría haber aportado resultados falsos positivos por reacciones cruzadas con otras especies (Lind et al, 1984), o verdaderos positivos en infecciones de vía aérea superior por Mycoplasma pneumoniae y NAC por otro microorganismo. En cualquier caso, la especificidad de esta técnica queda lo suficientemente bien establecida al no haberse encontrado resultados positivos en enfermos con NAC por otro microorganismo.

La PCR obtuvo una sensibilidad del 58.3% para el diagnóstico de infección por

Chlamydia pneumoniae. La concordancia entre PCR y serología -única técnica con la que se comparó la PCR- fue del 40%. La PCR, por otro lado, aportó 3 nuevos diagnósticos no obtenidos por serología (por no disponer de muestras pareadas para estudio). En la actualidad, el cultivo en muestras faríngeas se considera como la técnica gold standart para el diagnóstico de infección por Chlamydia pneumoniae, y la PCR ha demostrado una excelente correlación, que oscila entre el 76.5-100% en diversas series ([Tabla 1-14](#)), y ausencia de reacciones cruzadas con Chlamydia trachomatis y Chlamydia psittaci (Campbell et al, 1991). Sin embargo, el hallazgo de cultivos positivos en el frotis faríngeo de individuos asintomáticos (Hammerschlag et al, 1992), permite dudar del empleo de tales muestras para el diagnóstico de infecciones agudas. La PCR, por otro lado, ha demostrado una desigual correlación con la serología en diversos estudios. Así, cuando se han utilizado muestras pareadas la correlación ha sido del 75% (Grayston, 1993). Sin embargo, cuando sólo se estudiaba una primera muestra, la correlación fue del 38.8% (Gaydos et al, 1992). Además, es escasa la especificidad de la serología en algunas series clasificando el 18.8% de individuos asintomáticos como infectados (Gaydos et al, 1992). Por otro lado, algunos trabajos han demostrado reacciones cruzadas entre diversas especies de Chlamydia utilizando la MIF como técnica serológica (Ekman et al, 1993), por lo que algunos resultados de la serología en nuestra serie podrían ser falsos positivos. El hecho de que en el 29% de los diagnósticos serológicos para infección por microorganismos del género Chlamydia obtuviéramos resultados positivos para ambas especies estudiadas (Pneumoniae y psittaci), apoyaría esta observación.

Por otro lado, el 50% de nuestros pacientes con diagnóstico de infección por Chlamydia pneumoniae evolucionaron favorablemente tras la instauración de tratamiento con β -lactámicos, situación ya observada con anterioridad (Chirgwin et al, 1991). Esto, junto al hecho de que en el 66.6% de las infecciones mixtas en nuestra serie estuviera implicada Chlamydia spp, arroja una sombra de duda sobre el papel patógeno de este microorganismo en algunos casos (Chirgwin et al, 1991). Ante esta situación la PCR practicada en muestras obtenidas por PTA aparece como una técnica que eliminaría la posibilidad de obtener resultados positivos de individuos asintomáticos, y confirmaría los diagnósticos de la serología.

La sensibilidad de la PCR para el diagnóstico de infección por Pneumocystis carinii ha sido del 85.7% en muestras obtenidas por PTA y del 66.6% en el esputo, en ambos casos superior a los resultados obtenidos por la tinción de plata de metenamina. La PCR en muestras de PTA logró diagnosticar 4 nuevos casos -el 57% del total de casos- de infección por Pneumocystis carinii. Estos resultados han sido confirmados en una serie más amplia, donde la PCR obtuvo una sensibilidad del 92.8% frente a la obtenida de la tinción de plata, 65% (Nogués et al, 1993).

No hemos logrado obtener datos fiables sobre la eficacia de la PCR para el diagnóstico de infección por Legionella pneumophila, puesto que fue aplicada en 19 casos sin diagnóstico microbiológico establecido y resultó negativa en los 19 casos.

En resumen, podemos considerar la PCR en muestras obtenidas por PTA como una técnica excelente para el diagnóstico de infección por Pneumocystis carinii, mejorando las técnicas empleadas hasta la fecha; buena para el diagnóstico de infección por Streptococcus pneumoniae, con resultados superiores a los cultivos e inferiores a los obtenidos por las técnicas de detección de antígenos; y regular para el diagnóstico de infección por Mycoplasma pneumoniae y Chlamydia pneumoniae, aunque la dudosa especificidad de algunos resultados de la serología, obliga a la realización de nuevos estudios en que la PCR sea comparada con los resultados obtenidos por cultivo como técnica gold-standart.

4. Valoración de los resultados de la PTA

Hemos realizado un estudio donde, por primera vez, la PTA es utilizada como método invasivo de obtención de muestras en pacientes con NAC no seleccionados. Hasta la fecha, los diversos estudios realizados intentaban valorar la eficacia diagnóstica de la PTA en individuos con enfermedad grave o que no respondían adecuadamente al tratamiento ([Tabla 1-11](#)).

En cuanto a su aplicabilidad, la hemos considerado óptima puesto que el 93.2% de nuestros pacientes pudieron someterse a la técnica. Este porcentaje supera el obtenido por Ostergaard y colaboradores (1993) en una población similar, que utilizando la punción transtraquel como técnica invasiva, sólo pudo ser aplicada en el 46.8% de los casos. No podemos aportar datos sobre la aplicabilidad de la broncoscopia puesto que esta técnica siempre se ha considerado en poblaciones seleccionadas (Jiménez et al, 1993).

Con el empleo de los métodos convencionales de diagnóstico microbiológico - tinciones y cultivo-, la sensibilidad de la PTA ha resultado ser del 25.3%.

Nuestros resultados aparecen sensiblemente inferiores a la media, situada en torno al 56% (Bartlett, 1994). Diversos factores han podido contribuir a este hecho. Por un lado, el alto porcentaje de enfermos tratado con anterioridad -cerca del 40%-, puede haber provocado un descenso en la positividad de los cultivos. Es conocida la influencia que el tratamiento antibiótico previo tiene sobre los resultados de los cultivos de la PTA. Así, en la serie de Zalacaín y colaboradores (1993), con un porcentaje de enfermos tratado con anterioridad del 57%, la sensibilidad del cultivo de la PTA fue del 36%, sensibilidad que se elevó al 54.6% en los enfermos sin tratamiento previo. Por otro lado, es lógico pensar que los resultados de la PTA en enfermos con NAC grave - probablemente, con mayor número de microorganismos y afectación radiológicas de mayor tamaño- sean superiores a los obtenidos por la PTA en enfermos con NAC no seleccionados por su gravedad. A este respecto, Zalacaín y colaboradores (1995) han analizado la influencia del tamaño de la condensación radiológica sobre los resultados de la PTA. La sensibilidad del cultivo de la PTA en enfermos con afectación pulmonar segmentaria fue del 15.8%, mientras que la sensibilidad en pacientes con afectación lobar fue del 53.8%, diferencia estadísticamente significativa. Por último, la proporción de gérmenes cultivables con métodos convencionales en nuestro estudio no ha superado el 49%, sin embargo en otras series, esta proporción llega al 95% de los casos (Zalacaín et al, 1993). Resulta lógico pensar que cuando no se seleccionan los pacientes para la PTA, la proporción de gérmenes atípicos, que originan procesos neumónicos tradicionalmente considerados leves -como Mycoplasma, Chlamydia y virus- (Pennington, 1994) aumente y, en consecuencia, la posibilidad de que los cultivos de la PTA sean positivos, disminuya.

La introducción de nuevas técnicas de diagnóstico microbiológico como son la detección de antígenos y la PCR, ha servido para incrementar la sensibilidad de la PTA hasta un 61.7%. Si analizamos por separado la influencia de cada uno de los métodos empleados obtendremos que, de los 39 nuevos diagnósticos, 51.2% fueron confirmados por la detección de antígenos bacterianos y 64.1% fueron confirmados por PCR.

Desde este punto de vista parece que la aportación de ambas técnicas fue similar. Sin embargo, si analizamos la aportación de estas técnicas al conjunto del estudio sobre NAC, la situación cambia sensiblemente. Así, mientras la técnica de detección de antígenos confirmó el 84.2% de los diagnósticos realizados por cultivo y añadió 18 nuevos diagnósticos, la PCR confirmó, tan sólo, el 52.2% de los diagnósticos efectuados por cultivos y serología, y añadió 13 nuevos diagnósticos. Esta situación viene explicada por la eficacia superior que la

detección de antígeno neumocócico tiene, con respecto a la PCR y los cultivos, para el diagnóstico de infección por Streptococcus pneumoniae. Sin embargo, la PCR para el diagnóstico de infección por Mycoplasma pneumoniae y Chlamydia pneumoniae no fue tan eficaz como la serología.

De forma global, la PTA y el conjunto de técnicas microbiológicas practicadas en la muestra obtenida, lograron confirmar el 34.3% de los diagnósticos realizados por los métodos convencionales de diagnóstico, y añadió 35 nuevos diagnósticos ([Tabla 4-24](#)). Desde otro punto de vista podemos afirmar que de haber utilizado la PTA como única técnica diagnóstica, de los 102 diagnósticos microbiológicos realizados, se habrían confirmado 58, lo que supone el 56.8% del total. Este porcentaje supera sensiblemente el conseguido por el conjunto de métodos de diagnóstico convencional en la mayoría de las series que incluyen enfermos con NAC ([Tabla 1-2](#)).

Aunque se trata de poblaciones diferentes, los resultados de la PTA no varían enormemente de los obtenidos por la broncoscopia. Así, la sensibilidad de la broncoscopia en enfermos con NAC grave que habían recibido tratamiento previo fue del 21% (Torres et al, 1989), mientras que si la técnica se practica en enfermos que no han recibido tratamiento previo, la eficacia de la técnica no supera el 70% (Jiménez et al, 1993).

Es obligado destacar los resultados de la PTA en el manejo de enfermos con infección por VIH. Mientras que los métodos convencionales lograron diagnosticar el 42.8% de las infecciones bacterianas (Streptococcus pneumoniae y Haemophilus influenzae), la PTA logró diagnosticar el 85.7% de los casos. Si centramos nuestra atención sobre las infecciones oportunistas diagnosticadas (Pneumocystis carinii, Mycobacterium tuberculosis y Cryptococcus neoformans), los métodos convencionales diagnosticaron el 54.4% de los casos, mientras que la PTA clasificó correctamente el 72.7% ([Tabla 4-24](#)). A este respecto, la escasa eficacia de la PTA para diagnosticar tuberculosis (33.3%), contrasta con los excelentes resultados para Pneumocystis carinii (85.7%). Es probable que la introducción de la PCR aplicada en muestras de PTA para el diagnóstico de tuberculosis mejore el rendimiento de las tinciones y el cultivo. En este sentido, Querol y colaboradores (1995) han analizado la eficacia de la PCR en 314 muestras (28 de las cuales correspondían a BAL por broncoscopia; con una sensibilidad para la PCR, cultivos y tinción del 97%, 88% y 65%, la PCR detectó genoma de Mycobacterium tuberculosis en el 22.7% de enfermos con lesiones residuales, sin evidencia de infección activa. Es probable que próximos estudios con cuantificación de los resultados de la PCR sirvan para distinguir entre infección latente e infección activa (Palomares et al, 1992). Finalmente, los excelentes resultados obtenidos por la PTA en enfermos con infección por VIH ya ha sido confirmada en series más amplias. Así, Falguera y colaboradores (1993) obtuvieron una sensibilidad del 61.7% aplicando esta técnica sobre 45 pacientes. Estos resultados son comparables con los obtenidos por la broncoscopia en series anteriores. Así, Stover y colaboradores (1984), obtuvieron una sensibilidad de la broncoscopia (BAL y biopsia transbronquial) del 65% en 72 enfermos con infección por VIH. Recientemente, Cazzadori y colaboradores (1995) analizaron los resultados del BAL y biopsia transbronquial en 79 enfermos con infección por VIH, obteniendo unas sensibilidades del 77.3% y del 47.6%, respectivamente.

En cuanto a los efectos indeseables, debemos apuntar que la técnica fue bien tolerada en el 87.2% de los enfermos. Un episodio de hemoptisis autolimitada ocurrió en el 6.3% de los enfermos, el 3.6% se quejó de dolor torácico (1 enfermo necesitó analgesia) y en el 2.7% de los casos, observamos neumotórax post-punción, que en ningún caso requirió la colocación de tubo de drenaje pleural, ni afectó al curso clínico de la enfermedad ([Tabla 4-11](#)). Las cifras son similares a las obtenidas en series previas con enfermos graves que

utilizaron el mismo tipo de aguja de punción. Así, Dorca (1988) obtuvo un porcentaje de neumotórax no drenados del 2.4% (además, un neumotórax tuvo que ser drenado) y hemoptisis leve en el 3.5% de los casos. En la serie de Zalacaín y colaboradores, las cifras son similares, con un 2% de casos con dolor torácico, 1.1% de casos con hemoptisis leve y 3.2% de casos con neumotórax (en ningún caso hubo necesidad de colocar tubo pleural de drenaje). Ya hemos analizado arriba (ver yatrogenia de la PTA) que no encontramos relación causa-efecto entre los 2 pacientes que fallecieron y la PTA.

De los 3 casos de neumotórax, 2 correspondían a enfermos con infección por VIH con infección por Pneumocystis carinii. Con anterioridad a la epidemia del infección por VIH, ya se había descrito una estrecha relación entre neumonía por Pneumocystis carinii y neumotórax (Walzer et al, 1974). La prevalencia de neumotórax entre individuos con infección por VIH es del 2%, superior a la de la población general (Miller y Mitchell, 1995). En una revisión de 100 radiografías de penfermos con neumonía por Pneumocystis carinii, el 10% presentaba áreas quísticas y el 7% neumotórax (De Lorenzo, 1987). En la actualidad, hay autores que aconsejan pensar en Pneumocystis carinii como primera opción en pacientes con infección por VIH que desarrollan neumotórax (Sepkowitz et al, 1991). Por otro lado, Díaz y colaboradores (1992) han descrito afectación pulmonar del virus del infección por VIH en forma de cambios enfisematosos, constituyendo un factor de riesgo para el desarrollo de neumotórax, aunque otros autores sostienen que los cambios enfisematosos son consecuencia del estado de malnutrición asociado a la infección (Sahabjami, 1992).

En consecuencia, si centramos nuestra atención en individuos sin infección por VIH, la frecuencia de neumotórax tras PTA en población no seleccionada, no supera el 0.9% del total de casos.

En la actualidad, la broncoscopia se considera la técnica invasiva de elección en individuos con NAC grave. Sin embargo, esta técnica no se encuentra exenta de efectos adversos. Así, se han descrito episodios de fiebre autolimitada, neumonía, arritmias y paro cardíaco tras la realización de la técnica (Pereira et al, 1978). En enfermos con infección por VIH y otros inmunodeprimidos, la amplia variedad de microorganismos potencialmente implicados, obliga a la práctica de biopsia transbronquial durante la broncoscopia, técnica con un riesgo de neumotórax no despreciable. Así, Cazzadori y colaboradores (1995) han obtenido un porcentaje de neumotórax del 2.5% (3 de los 4 neumotórax tuvieron que ser drenados).

Ante esta situación, la PTA aparece como una técnica invasiva, con una eficacia y riesgo de efectos secundarios similar al obtenido por la broncoscopia, pero con un nivel de tolerancia por parte del enfermo y sencillez técnica superior (Zalacaín et al, 1993).

F) Conclusiones

1 Los microorganismos protagonistas de la NAC de Lleida son, por este orden: **Streptococcus pneumoniae**, **Mycoplasma pneumoniae** y **Chlamydia pneumoniae**. El importante porcentaje de casos diagnosticados, el **83.8%** del total, concede a los resultados de nuestro estudio una evidente seguridad en el manejo diario de la NAC.

Al considerar determinados subgrupos de población constatamos que:

a) Para pacientes jóvenes sin patología de base los microorganismos responsables de NAC fueron, por este orden: **Mycoplasma pneumoniae** e, microorganismos del género *Chlamydia* y **Streptococcus pneumoniae**.

b) Para pacientes con edad superior a 65 años los microorganismos responsables de NAC fueron, por este orden: **Streptococcus pneumoniae**, microorganismos del género *Chlamydia* y virus **Influenza A**.

c) Los enfermos con infección por VIH forman un subgrupo importante de población, constituyendo cerca del 40% de los pacientes con enfermedad crónica de base. Entre estos pacientes los microorganismos responsables de NAC fueron, por este orden: **Pneumocystis carinii**, **Streptococcus pneumoniae** y **Mycobacterium tuberculosis**.

En nuestro estudio, una búsqueda exhaustiva no ha logrado relacionar **Legionella pneumophila** con la NAC.

2 La PTA constituye una excelente técnica de obtención de muestras respiratorias no contaminadas, aplicable en nuestra serie, a un **93.2%** de la población con NAC no seleccionada. La introducción de nuevas técnicas microbiológicas permitió incrementar la sensibilidad global de la PTA de un **25.3%** a un **61.7%**.

3 La sensibilidad de las pruebas de **detección de antígenos bacterianos** en muestras obtenidas por PTA para el diagnóstico de NAC por **Streptococcus pneumoniae** y **Haemophilus influenzae**, fueron del **96.2%** y **66.6%**, respectivamente. Para el diagnóstico de infección por **Streptococcus pneumoniae**, la determinación de antígenos bacterianos resultó ser la prueba más sensible. Sin embargo, el cultivo de la muestra de PTA fue el método más sensible en el diagnóstico de infección por **Haemophilus influenzae**.

4 La sensibilidad de la técnica de la PCR aplicada a muestras obtenidas por PTA para el diagnóstico de infección por **Streptococcus pneumoniae**, **Chlamydia pneumoniae**, **Mycoplasma pneumoniae** y **Pneumocystis carinii** fue del **55.5%**, **58.3%**, **47.3%** y **85.7%**, respectivamente. Para el diagnóstico de infección por **Streptococcus pneumoniae** la PCR fue superior a los resultados de los cultivos pero se vió superada por la técnica de detección de antígenos. Para el diagnóstico de infección por **Chlamydia pneumoniae** y **Mycoplasma pneumoniae** la PCR se vió superada por los resultados de la serología; sin embargo, la controversia existente en la actualidad sobre la especificidad de sus resultados, permite situar a la PCR como técnica confirmatoria. Para el diagnóstico de infección por **Pneumocystis carinii**, la PCR resultó muy superior a las actuales técnicas de diagnóstico.

5 En nuestro estudio la incorporación de la PTA junto con las nuevas técnicas microbiológicas empleadas permitió incrementar el porcentaje de casos diagnosticados de un **54%** a un **83.8%**. El elevado porcentaje de nuevos diagnósticos -junto con el escaso número de efectos secundarios observado- justificaría su empleo, como técnica diagnóstica invasiva, en estudios epidemiológicos sobre la NAC.

Bibliografía

Aguirre I, Bilbao JJ, Olarreaga M, Narzábal M, Aguinaga JR, Ventura I. Neumonías adquiridas en la comunidad de Andoain. *Aten Primaria* 1993; 12: 359-362.

Ajello GW, Bolan JA, Hayes PS, Lehmann D, Montgomery J, Feeley JC et al. Commercial latex agglutination tests for detection of Haemophilus influenzae type b and Streptococcus pneumoniae antigens in patients with bacteriemic pneumonia. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 1388-1391.

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

Antela A, Guerrero A, Meseguer M, González-Sáinz J, Escudero R, Pérez-Elías MJ et al. Neumonías extrahospitalarias: estudio prospectivo de 101 pacientes adultos e inmunocompetentes durante un año. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1993;11: 525-530.

Austrian R. Pneumococcal pneumonia. Diagnostic, epidemiologic, therapeutic and prophylactic considerations. *Chest* 1986; 90: 738-743.

Austrian R, Gold J. Pneumococcal bacteriemic with special reference to bacteriemic pneumococcal pneumonia. *Ann Intern Med* 1964; 60: 759-776.

Avery OT, MacLeod CM, MacCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J Exp Med* 1944; 79: 137-158.

Aylward RB, Burdge DR. Ribavirin therapy of adult respiratory syncytial pneumonitis. *Arch Intern Med* 1991; 151: 2303-2304.

Bahal N, Nahata MC. The new macrolide antibiotics: azithromycin, clarithromycin, dirithromycin and roxithromycin. *Ann Pharmacother* 1992; 26: 46-55.

Bartlett JG. Invasive diagnostic techniques in pulmonary infections. En: Pennington JE, ed. *Respiratory infections: Diagnosis and management*, 3d ed. Raven Press, Ltd., New York 1994: 73-99.

Bartlett RG. Medical Microbiology: quality, cost and clinical relevance. John Wiley and Sons, Inc, New York 1974, 24-31.

Bates JH, Campbell GD, Barron AL, McCracken GA, Morgan PN, Moses EB et al. Microbial etiology of acute pneumonia in hospitalized patients. *Chest* 1992; 101: 1005-1012.

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* 1993; 48: 1227-1229

Berk SL, Verghese A, Holtsclaw SA, Smith JK. Enterococcal pneumonia. Occurrence in patients receiving broad-spectrum antibiotic regimens and enteral feeding. *Am J Med* 1983; 74: 153-154.

Bernet C, Garret M, de Barbeyrac B, Bebear C, Bonnet J. Detection of Mycoplasma pneumoniae by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2492-2496.

Blasi F, Legnani D, Lombardo VM, Negretto GG, Magliano E, Pozzoli R et al. Chlamydia pneumoniae infection in exacerbations of chronic bronchitis. *Eur Respir J*, 1993, 6: 19-22.

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.

Boersma WG, Löwenberg, Holloway Y, Kutschrütter H, Snidjer JAM, Koëter GH. Rapid detection of pneumococcal antigen in pleural fluid of patients with community-

acquired pneumonia. *Thorax* 1993; 48: 160-162.

Bouza E. Infección neumocócica. Patrones de susceptibilidad antibiótica en España. *Enf Infecc Microbiol Clin* 1993; 11 (suppl 1): 23-27.

Brancati FL, Chow JW, Wagener MM, Vacarello SJ, Yu VL. Hospital and 2-year mortality after community-acquired pneumonia. *Lancet* 1993; 342: 30-33.

Burman L, Trollfors B, Andersson B, Henrichsen J, Juto P, Kallings I et al. Diagnosis of pneumonia by cultures, bacterial and viral antigen detection tests, and serology with special reference to antibodies against pneumococcal antigens. *JID* 1991; 163: 1087-1093.

Burt ME, Flye MW, Weber BL et al. Prospective evaluation of aspiration needle, transbronchial, and open lung biopsy in patients with pulmonary infiltrates. *Ann Thorac Surg* 1981; 32: 146-153.

Campbell JF, Barnes RC, Kozarsky PE, Spika JS. Culture-confirmed pneumonia due to *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis* 1991; 164: 411-413.

Campbell LA, Pérez Melgosa M, Hamilton DJ, Kuo CC, Grayston JT. Detection of *Chlamydia pneumoniae* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 434-439.

Cano S, Capote F, Pereira A, Calderón E, Castillo J. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients without predisposing illnesses. *Chest* 1993; 104: 376-381.

Carpenter JL. Klebsiella pulmonary infections: Occurrence at one medical center and review. *Rev Infect Dis* 1990; 12: 672-682.

Carter BI, Woodhead JC, Cole KJ, Milavetz G. Gastrointestinal side effects with erythromycin preparations. *Drug Intelligence and Clinical Pharmacy* 1987; 21: 734-738.

Cartwright KAV, Jones DM, Smith AJ, Stuart JM, Kaczmarek EB, Palmer SR. Influenza A and meningococcal disease. *Lancet* 1991; 338: 554-557.

Cazzadori A, Di Perri G, Todeschini G, Luzzati R, Boschiero L, Perona G et al. Transbronchial biopsy in the diagnosis of pulmonary infiltrates in immunocompromised patients. *Chest* 1995; 107: 101-106.

Celis R, Torres A, Gatell JM, Almela M, Rodríguez-Roisin R, Agustí-Vidal A. Nosocomial pneumonia. A multivariate analysis of risks and prognosis. *Chest*, 1988; 93: 318-324.

Chien SM, Pichotta P, Siepmann M, Chan CK. Treatment of community-acquired pneumonia. A multicenter, double-blind, randomized study comparing clarithromycin with erythromycin. *Chest* 1993; 103: 697-701.

Chien SM, Rawuji M, Mintz S, Rachlis A, Chan CK. Changes in hospital admission patterns in patients with HIV infection in the era of *Pneumocystis* prophylaxis. *Chest* 1992; 102: 1035-1039.

Chirgwin K, Roblin PM, Gelling M, Hammerschlag MR, Schachter. Infection with *Chlamydia pneumoniae* in Brooklyn. *J Infect Dis* 1991; 163: 757-761.

Congeni BL, Igel HJ, Platt MS. Evaluation of a latex particle agglutination kit in pneumococcal disease. *Ped Infect Dis* 1984; 3: 417-419.

Coonrod JD. Physical and immunologic properties of pneumococcal capsular polysaccharide produced during human infection. *J Immunol* 1974; 112: 2193-2201.

Coonrod JD, Drennan DP. Pneumococcal pneumonia: capsular antigenaemia and antibody responses. *Ann Intern Med* 1976; 84: 254-260.

Dasí MA, Ledesma E. Reacción en cadena de la polimerasa. En Camarena JJ, Camaró ML, Catalán V, Dasí MA, Ledesma E, Llorca J eds. *Fundamentos de la PCR en microbiología*. Madrid. Unipath SA 1994: 7-29.

Davison M, Tempest B, Palmer DL. Bacteriologic diagnosis of acute pneumonia.

Comparison of sputum, transtracheal aspirates and lung aspirates. JAMA 1976; 235: 158-163.

De Lorenzo LJ, Huang CT, Stone DJ. Roentgenographic patterns of Pneumocystis carinii pneumonia in 104 patients with AIDS. Chest 1987; 91: 323-327.

Díaz PT, Clanton TL Pacht ER. Emphisema-like pulmonary disease associated with human immunodeficiency virus infection. Ann Intern Med 1992; 116: 124-128.

Domingo C, Roig J, Planas F, Bechini J, Tenesa M, Morera J. Radiographic appearance of nosocomial legionnaire`s disease after erythromycin treatment. Thorax 1991; 46: 663-666.

Dorca J. 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). Barcelona: Universidad de Barcelona, 1988.

Dorff GJ, Rytel MW, Farmer SG, Scanson G. Etiologies and characteristic features of pneumonias in a municipal hospital. Am J Med 1973; 266: 349-358.

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 (1): 95-102.

Dussaix E, Slim A, Tournier P. Comparison of Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and complement fixation test for detection of Mycoplasma pneumoniae antibodies. J Clin Pathol 1983; 36: 228-232.

Ebright JR, Rytel MW. Bacterial pneumonia in the elderly. J Am Ger Soc 1980; 28: 220-223.

Edelstein PH, Meyer RD. Legionella pneumonias. En: Pennington JE de. Respiratory infections: Diagnosis and management. New York; Raven Press Ltd, 1994: 470.

Eisenstein BI. The polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. N Eng J Med 1990; 322: 178-183.

Ekman MR, Leinonen M, Syrjälä, Linnanmäki E, Kujala P, Saikku P. Evaluation of serological methods in the diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* pneumonia during an epidemic in Finland. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1993; 12:756-760.

Ena J. Neumonía extrahospitalaria. Enferm Infecc Microbiol Clin 1995; 13: 166-172.

Esposito AL. Community acquired bacteriemic pneumococcal pneumonia. Arch Intern Med 1984; 144: 945-948.

Esteban JI, Dorca J, Alonso T, Barreiro B Prats E, Manresa F. Detección de antígenos neumocócicos en muestras obtenidas por punción transtorácica aspirativa. Ann Med (Barc) 1992; 78: 89.

Fagon JY, Chastre J, Domart Y, Trouillet JL, Pierre J, Darne C et al. Nosocomial pneumonia in patients receiving continuous mechanical ventilation. Prospective analysis of 52 episodes with use of a protected specimen brush and quantitative culture techniques. Am Rev Respir Dis 1989; 139: 877-884.

Falguera M, Nogués A, Ruiz-González A, García M, Puig T, Rubio-Caballero M. Transthoracic needle aspiration in the study of pulmonary infections in patients with HIV. Chest 1994; 106: 697-702.

Fang GD, Fine M, Orloff J, Arisumi D, Victor L, Kapoor W et al. New and emerging etiologies for Community-acquired pneumonia with implications for therapy. Medicine 1990; 69: 307-316.

Farr BM, Kaiser PL, Harrison BDW, Connolly CK. Prediction of microbial aetiology at admission to hospital for pneumonia from the presenting clinical features.

Thorax 1989; 44: 1031-1035.

Farr BM, Mandell GL. Gram-positive Pneumonia. En: Pennington JE ed: Respiratory infections. Diagnosis and management (3rd edition). Raven Press New York 1994:349-367.

Farr BM, Sloman AJ, Fisch MJ. Predicting death in patients hospitalized for community-acquired pneumonia. *Ann Intern Med* 1991; 115: 428-436.

Farrington M, Rubenstein D. Antigen detection in pneumococcal pneumonia. *J Infect* 1991; 23: 109-116.

Fedullo AJ, Swinburn AJ. Relationship of patient age to clinical features and outcome for in-treatment of pneumonia. *J Gerontol* 1985; 40: 29-33.

Feinsilver SH, Fein AM, Niederman MS, Schultz DE, Faegenburg DH. Utility of fiberoptic bronchoscopy in nonresolving pneumonia. *Chest* 1990; 98: 1322-26.

Fine MJ, Singer DE, Hanusa B, Lave JR, Kapoor WN. Validation of a pneumonia prognostic index using Medisgroups comparative hospital database: *Am J Med* 1993; 94: 153-159.

Finegold SM, Baron EJ. Métodos no tradicionales para la identificación y detección de patógenos y de sus productos. En: Finegold SM, Baron EJ, eds. *Diagnóstico Microbiológico 7ª ed.* Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana 1989: 151-162.

Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W et al. Legionnaires` disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Eng J Med* 1977; 297: 1189-1197.

Frieden TR, Mangi RJ. Inappropriate use of oral ciprofloxacin. *JAMA* 1990; 264: 1438-1440.

Garibaldi RA. Epidemiology of community-acquired respiratory tract infections in adults. *Am J Med (suppl 6B)* 1985; 78: 32-37.

Gaztelorrutia L, Zalacaín R, Rubio G et al. Actualidad de la penicilina en las neumonías neumocócicas extrahospitalarias. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1994; 12: 17-20.

Girod JC, Reichman RC, Winn WC, Klaucke DN, Vogt RL, Dolin R. Pneumonic and nonpneumonic forms of legionellosis: the result of a common-source exposure to legionella pneumophila. *Arch Intern Med* 1982; 142: 545-547.

Guerrero A, Wang SP, González-Sáenz J, Quereda C, Grayston JT. Prevalencia de la infección por Chlamydia pneumoniae en neumonías en una muestra de población hospitalaria española. *Med Clin (Barc)* 1991; 96: 285-286.

Gnarpe H, Gnarpe J. Increasing prevalence of specific antibodies against Chlamydia pneumoniae in Sweden. *Lancet* 1993; 341: 381.

Gransden ER, Eykyn SJ, Phillips I. Pneumococcal pneumonia: 325 episodes diagnosed at St. Thoma´s Hospital. *Br Med J* 1985; 290: 505-508.

Gayston JT. Chlamydia pneumoniae, strain TWAR pneumonia. *Annu Rev Med* 1992; 43: 317-323.

Grayston JT, Aldous MB, Easton A, Wang SP, Kuo CC, Campbell LA, Altman J. Evidence that Chlamydia pneumoniae causes pneumonia and bronchitis. *J Infect Dis* 1993; 168: 1231-1235.

Grayston JT, Campbell LA, Kuo CC et al. A new respiratory tract pathogen: Chlamydia pneumoniae strain TWAR. *J infect Dis* 1990; 161: 618-625.

Grayston JT, Kuo CC, Campbell LA, Wang SP. Chlamydia pneumoniae sp. nov. for Chlamydia strain TWAR. *Int Syst Bacteriol* 1988; 39: 88-90.

Grayston JT, Kuo CC, Wang SP, Altman J. A new Chlamydia psittaci strain called TWAR from acute respiratory tract infections. *N Eng J Med* 1986; 315: 161-168.

Grayston JT, Modhorst C, Bruu AL, Vene S, Wang SP. Country wide epidemics of

Chlamydia pneumoniae, strain TWAR, in Scandinavia, 1981-1983. J Infect Dis 1989; 159: 1111-1114.

Grayston JT, Wang SP, Kuo CC, Campbell LA. Current Knowledge on Chlamydia pneumoniae, strain TWAR, an important cause of pneumonia and other acute respiratory diseases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1989; 8: 191-202.

Gronhager-Riska C, Saikku P, Riska H, Froseth B, Grayston JT. Antibodies to TWAR -a novel type of Chlamydia, in Sarcoidosis. En: Grassi C, Rizzato G, Pozzi E, eds. Sarcoidosis and other granulomatous diseases. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1988; 297-301.

Gudiol F, Solans P, Sabaté X, Fernández Viladrich P, Pac V. Neumonía neumocócica bacteriémica. A propósito de setenta casos. Med Clin (Barc) 1977; 69:1-8.

Hamedani P, Ali J, Hafeez S, Bachand R, Dawood G, Queresi S et al. The safety and efficacy of clarithromycin in patients with legionella pneumonia. Chest 1991; 100:1503-1506.

Hammerschlag MR, Chirgwin K, Roblin PM et al. Persistent infection with Chlamydia pneumoniae following acute respiratory illness. Clin Infect. J Infect Dis 1992; 14: 178-82.

Hansman D, Bullen MM. A resistant Pneumococcus. Lancet 1967; 2: 264-265.

Hendley JO, Sande MA, Stewart PM, Gwaltney JM. Spread of Streptococcus pneumoniae in families. Carriage rates and distribution of types. J Infect Dis 1975; 132: 55-61.

Higuchi R. Simple and rapid preparation of samples for PCR. In HA Erlich (ed). PCR technology. Principles and applications for DNA amplification. Stockton Press, New York 1989: 31-38.

Holloway Y, Boersma WG, Kuttscrutter H, Snijder JA. Pneumococcal capsular antigen detection in presence of penicillin in vitro. Scand J Infect Dis 1993; 25 (3): 317-322.

Jacobs JL, Libby DM, Winters RA, Belmont DM, Fried DE, Hartman BJ et al. Pneumocystis carinii pneumonia in adults without predisposing illnesses. N Eng J Med 1991; 324: 246-250.

Janoff EM, Breiman RF, Daley CL, Hopewell PC. Pneumococcal disease during HIV infection. Epidemiologic, clinical and immunologic perspectives. Ann Intern Med 1992; 117: 314-324.

Jastremski MS. Adult respiratory distress syndrome due to Mycoplasma pneumoniae. Chest 1979; 75:529.

Jiménez P, Meneses M, Saldías F, Velásquez M. Pneumococcal antigen detection in bronchoalveolar lavage fluid from patients with pneumonia. Thorax 1994; 49: 872:874.

Jones RN, Erwin ME, Barret MS, Helms C, Groserode M. Antimicrobial susceptibility of epidemic and non-epidemic L. pneumophila isolates, a ten year longitudinal study. 1st International Conference on the macrolides, azalides and streptogramins, Santa Fe, New Mexico, 1992.

Kauffman RS. Viral pneumonia. En Pennington JE de: Respiratory infections. Diagnosis and management. Raven Press New York 1994: 515-532.

Kirtland SH, Winterbauer RH. Slowly resolving, chronic, and recurrent pneumonia. Clin Chest Med 1991; 12: 303-318.

Kirtland SH, Winterbauer RH, Dreis DF, Pardee EN, Springmeyer SC. A clinical profile of chronic bacterial pneumonia. Report of 115 cases. Chest 1994; 106: 15-22.

Kislak JW, Razavi LMB, Daly AK, Finland M. Susceptibility of pneumococci to nine antibiotics. Am j Med Sci 1965; 250: 261-268.

Kitada K, Oka S, Kimura S, Shimada K, Serikawa J, 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: 1985-1990.

Kleemola M, Saikku P, Visakorpi R, Wang SP, Grayston JT. Epidemics of pneumonia caused by TWAR, a new Chlamydia organism, in military trainee in Finland. *J Infect Dis* 1988; 157: 230-236.

Korppi M, Heiskaken-Kosma T, Jalonen E, Saikku P, Leinonen, Halonen P et al. Aetiology of community-acquired pneumonia in children treated in hospital. *Eur J Pediatr* 1993; 152: 24-30.

Levin DC, Schwarz MI, Matthay RA, Laforce FM. Bacteremic Haemophilus influenzae pneumonia in adults. A report of 24 cases and a review of the literature. *Am J Med* 1977; 62: 219-224.

Lee SH, Charoenying S, Brennann T, Markowski M, Mayo D. Comparative studies of three serologic methods for the measurement of Mycoplasma pneumoniae antibodies. *Am J Clin Pathol* 1989; 92: 342-347.

Lind K, Lindhardt BO, Schütten HJ, Blom J, Christiansen C. Serological cross-reactions between Mycoplasma genitalium and Mycoplasma pneumoniae. *J Clin Microbiol* 1984; 20: 1036-43.

Liñares J, Alonso T, Pérez JL, Ayats J, Domínguez MA, Pallarés R et al. Decreased susceptibility of penicillin-resistant pneumococci to twenty-four b-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1992; 30: 279-288.

Liñares J, Tubau F, Alcaide F, Mariscal D, Ardanuy C, Martín R. Actividad bactericida de cinco antibióticos β-lactámicos frente a Streptococcus pneumoniae. *Enf Infec Microbiol Clin* 1993; 11 (Supl 1): 23-27.

Llorente JL, Zalacaín R, Gaztelurrutia L, Talayero N, Pérez M, Badiola C. Características clínicas y etiológicas de la neumonía en la comunidad en ancianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1994; 12: 27-31.

Macfarlane JT, Finch RG, Ward MJ, Macrae AD. Hospital study of adult community-acquired pneumonia. *Lancet* 1982; ii: 255-258.

Manresa F, Dorca J. Mycoplasma, coxiella and Chlamydial infection. Current opinion in infectious diseases 1994; 7: 173-177.

Marfin AA, Sporrer J, Moore PS, Siefkin AD. Risk factors for adverse outcome in persons with pneumococcal pneumonia. *Chest* 1995; 107: 457-62.

Marrie TJ. Community-acquired pneumonia. State-of-the-art clinical article. *Clin Infect Dis* 1994; 18: 501-513.

Marrie TJ. Mycoplasma pneumoniae pneumoniae requiring hospitalization, with emphasis on infection in the elderly. *Arch Intern Med* 1993; 153: 488-494.

Marrie TJ. Chlamydia pneumoniae. *Thorax* 1993; 48: 1-4.

Marrie TJ, Durant H, Yates L. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization: 5-year prospective study. *Rev Infect Dis* 1989; 11: 586-599.

Marrie TJ, Grayston JT, Wang SP, Kuo CC. Pneumonia associated with the TWAR strain of Chlamydia. *Ann Intern Med* 1987; 106: 507-511.

Marrie TJ, Harczy M, Mann OE et al. Culture-negative endocarditis probably due to Chlamydia pneumoniae. *J infect Dis* 1990; 161: 127-129.

Martos A, Mascaró J, Santín M, Ariza J, Carratalá J, Podzamczar D. Cryptococcus pulmonar en el SIDA. *Enferm Infec Microbiol* 1992; 10: 607-610.

Mercat A, Nguyen J, Dautzenberg B. An outbreak of pneumococcal pneumonia in two men`s selters. *Chest* 1991; 99: 147-151.

Miller RF, Foley NM, Kessel D, Jeffrey AA. Community-acquired lobar pneumonia in patients with HIV infection and AIDS. *Thorax* 1994; 49: 367-368.

Mizrachi HH, Valenstein PV. Randomized trial interpreting sputum quality in a clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 2327-2329.

Molinos L, Gullón JA, Riesgo C, Domínguez MJ, Martínez J. Neumonía extrahospitalaria por enterococo. ¿Una entidad por considerar?. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1995; 13: 319.

Moine P, Vercken JB, Chevret S, Chastang C, Gajdos P et al. Severe community-acquired pneumonia. Etiology, epidemiology and prognosis factors. *Chest* 1994; 105: 1487-1495.

Montes M, Cilla G, Alcorta M, Pérez-Trallero E. High prevalence of C.pneumoniae infection in children and young adults in Spain. *Ped Infect Dis J* 1992; 11: 972-973.

Moser KM, Maurer J, Jassy LAU, Kremsdorf R, Konopka R, Shure D et al. Sensitivity, specificity, and risk of the diagnostic procedures in a canine model of Streptococcus pneumoniae. *Am Rev Respir Dis* 1982; 125: 436-442.

Mouton Y, Beuscart C, Leroy O, Ajana F, Charrel J. Evaluation of ciprofloxacin versus amoxicilin+clavulanic acid or erithromycin for the empiric treatment of community-acquired pneumonia. *Pathol Biol Paris* 1991; 39: 34-37.

Mufson MA, Chang V Gill V, Wood SC, Romansky MJ, Chanock RM. The role of viruses, mycoplasmas and bacteria in civilian adults. *Am J Epidem* 1967; 76: 526-544.

Muñoz R, Coffey TJ, Daniels M, Dowson CG, Laible G, Casal J et al. Intercontinental spread of a multiresistant clone of serotype 23F Streptococcus pneumoniae. *J Infect Dis* 1991; 164: 302-306.

Musher DM. Streptococcus faecalis and other group D streptococci. En: Mandell GL, Douglas RG, Bennet JE, editores. Principles and practice of infectious diseases. New York Churchill Livingstone, 1990: 1152-1155.

Murray PR, Washington JA. Microscopy and bacteriologic analysis of expectorated sputum. *Mayo Clin Proc* 1975; 50: 339-344.

Musher DM. Pneumococcal pneumonia including diagnosis and therapy of infection caused by penicillin-resistant strains. *Infect Dis Clin North Am* 1991; 5: 509-521.

Musher DM Groover JE Rowland JM, Watson DA, Struewing JB, Baughn RE et al. Antibody to capsular polysaccharides of Streptococcus pneumoniae: prevalence, persistence, and response to revaccination. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 66-73.

Nogués A, García M, Rivas C, Falguera M, Puig T, Ruiz A. Detección de Pneumocystis carinii en muestras clínicas por la reacción en cadena de la polimerasa. Comparación con la técnica de metenamina de plata. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1993; 11: 143-146.

Norvick JA, Hackett AK, Yu VL, Muder RR. Klebsiella pneumoniae in the modern era: clinicoradiographic correlations. *South Med J* 1991; 84:200-204.

Oriola J. Metodología de la reacción en cadena de la polimerasa. *Rev Diag Biol* 1991; 40: 31-34.

Örtquist A, Hedlund J, Grillner L Jalonen E, Kallings I, Leinonen M. Etiology, outcome and prognostic factors in community-acquired pneumonia requiring hospitalization. *Eur Respir J* 1990; 3 (10): 1105-1113.

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.

Örtqvist A, Kalin M, Lejdebom LAU, Lundberg B. Diagnostic fiberoptic bronchoscopy and protected brush culture in patients with community-acquired pneumonia. *Chest* 1990; 97: 576-582.

Osler W. The principles and practice of Medicine, 4th edition. Appleton and CO, New York 1901: 108.

Ostergaard L, Andersen PL. Etiology of community-acquired pneumonia. Evaluation by transtracheal aspiration, blood culture and serology. *Chest* 1993; 104: 1400-1407.

Pachón J, Prados MD, Capote F, Cuello JA, Garnacho J, Verano A. Severe community-acquired pneumonia: aetiology, prognosis and treatment. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 369-373.

Palmer DL, Davison M, Lusk R. Needle aspiration of the lung in complex pneumonias. *Chest* 1980; 78: 16-21.

Palomares JC, Rodríguez Iglesias MJ, Cano RJ, Torres MJ. Reacción de la polimerasa en cadena. ¿Debe incorporarse en los laboratorios de microbiología clínica?. *Med Clin (Barc)* 1992; 99: 265-268.

Palomino J, García -Curiel A, Caballero FJ, Moreno I, Pichardo C. Pachón. Severe *Streptococcus pneumoniae* infections. Trends in antibiotic susceptibility. En: abstracts of the 6th International Congress for Infectious Diseases. Prague, 26-30 de abril, 1994.

Pallarés R, Gudiol F, Liñares J et al. Risk factors and response to antibiotic therapy in adults with bacteremic pneumonia caused by penicillin-resistant pneumococci. *N Eng J Med* 1987; 317: 18-22.

Pennington JE. Community-acquired pneumonia and acute bronchitis. En: Pennington JE ed. *Respiratory infections: Diagnosis and management*. New York. Raven Press Ltd 1994: 193-206.

Pereira W, Kovnat DM, Snider GL. A prospective cooperative study of complications following flexible fiberoptic bronchoscopy. *Chest*, 1978; 73: 813-816.

Pérez-Trallero E. Infecciones bacterianas respiratorias adquiridas en la comunidad: estrategias terapéuticas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1993; 11: 51-62.

Pérez Trallero E, Montes M. *Chlamydia pneumoniae*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1991; 5: 292-296.

Pesola GR, Charles A. Pneumococcal bacteremia with pneumonia. Mortality in acquired immunodeficiency syndrome. *Chest* 1992; 101: 150-155.

Pierce AK. Neumonías causadas por gérmenes aerobios gramnegativos. En: Fishman AP editor. *Tratado de neumología (2ª edición española)*, Barcelona. Ediciones Doyma SA 1991; vol 2: 1384-1396.

Polsky B, Gold JWM, Whimbey E, Dryjansky J, Brown AE, Schiffman G et al. Bacterial pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 1986; 104: 38-41.

Potgieter PD, Hammond MJJ. Etiology and diagnosis of pneumonia requiring ICU admission. *Chest* 1992; 101: 199-203.

Querol JM, Farga MA, Granda D, Gimeno C, García de Lomas J. The utility of PCR in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Chest* 1995; 107: 1631-1635.

Reilly S, Gaunt PN. Influenza A and meningococcal disease. *Lancet* 1991; 338: 1143-1144.

Rello J, Quintana E, Ausina V, Castella J, Luquin M, Net A et al. Incidence, etiology and outcome of nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients. *Chest* 1991; 100: 439-444.

Rello J, Quintana E, Ausina V, Net A, Prats G. A three-year study of severe acquired pneumonia with emphasis on outcome. *Chest* 1993; 103: 232-235.

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.

Roca V, Pérez-Cecilia E, Viñuelas J, Ferreiros J, Coello R, Picazo JJ. Bacteriemia por Streptococcus pneumoniae e infección por el VIH. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1991; 9: 268-271.

Roig J, Aguilar X, Ruiz J, Domingo C, Mesalles E, Manterola J et al. Comparative study of Legionella pneumophila and other nosocomial-acquired pneumonias. *Chest* 1991; 99: 344:350.

Saikku P, Mattila K, Nieminen MS et al. Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet* 1988; 2: 983-985.

Saikku P, Wang SP, Kleemola M, Brander E, Rusanen E, Grayston JT. An epidemic of mild pneumonia due to an unusual strain of Chlamydia psittaci. *J Infect Dis* 1985; 151: 832-839.

Schonwald S, Skerk V, Petricevik I, Car V, Majerus-Misic LAU, Gunjaca M. Comparison of three day and five-day courses of azithromycin in the treatment of atypical pneumonia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10: 877-880.

Scully BE, Fu KP, Neu HC. Farmacocinética después de la infusión intravenosa y de la inyección intramuscular. Ceftriaxona: cefalosporina de acción prolongada. Actas de un simposio. Versión castellana. Robert C. Moellering, de. *Am J Med* 1984; 125-130.

Sahebji H. Emphysema-like changes in HIV. *Ann Intern Med* 1992; 116: 876.

Sepkowitz KA, Telzak EE, Gold JWM, Bernard EM, Blum S, Carrow M et al. Pneumothorax in AIDS. *Ann Intern Med* 1991; 114: 455-459.

Sirvent JM, Verdaguer R, Ferrer MJ, AvilaFJ, Díaz-Prieto A, Carratalá J. Neumonía asociada a ventilación mecánica y profilaxis de estrés. Ensayo clínico aleatorizado de antiácidos y ranitidina frente a sucralfato. *Med Clin (Barc)* 1994; 102: 407-411.

Sobradillo V, Ansola P, Baranda F, Corral Q. Q fever pneumonia: a review of 164 community-acquired cases in the Basque country. *Eur Respir J* 1989; 2: 263-266.

Sobradillo V, Zalacaín R, Capelastegui A, Uresandi F, Corral J. Antibiotic treatment in pneumonia due to Q fever. *Thorax* 1992, 47: 276-278.

Sorensen J, Forsberg P, Hakanson E, Maller R, Sederholm C, Soren Let et al. A new diagnostic approach to the patient with severe pneumonia. *Scan J Infect Dis* 1989; 21: 33-41.

Standford CF, Connolly JH, Ellis WA, Smith ETM, Coyle PV, Montgomery WI et al. Zoonotic infections in Northern Ireland farmers. *Epidemiol Infect* 1990; 105: 565-570.

Starnbach MN, Falkow S, Tompkins S. Species-specific detection of Legionella pneumophila in water by DNA amplification and hybridization. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1257-1261.

Stout JE, Yu VL, Yee YC, Vacarello S, Diven W, Lee TC. Legionella pneumophila in residential water supplies: Environmental surveillance with clinical assessment for the Legionnaires' Disease. *Epidemiol Infect* 1992; 109: 49-57.

Stover DE, White DA, Romano PA, Gellene RA. Diagnosis of pulmonary disease in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Role of bronchoscopy and bronchoalveolar lavage.

Sullivan RJ, Dowdle WR, Marriae WM, Hierholzer JC. Adult pneumonia in a

general hospital. Arch Intern Med 1972; 129: 935-942.

Teira R, Zubero Z, Muñoz J, Alvarez M, Cisterna R, Santamaría JM. Neumonía por bacterias no oportunistas en pacientes infectados por VIH. Incidencia y valoración de una aproximación no invasiva. Enf Infec Microbiol Clin 1992; 10:11-16.

Téllez A, Pérez-Breña P, Fernández-Patiño MV, León P, Anda P, Nájera R. Acute respiratory disease in Spain: seven years of experience. Rev Infect Dis 1990; 12: 745-753.

Tilyard MW, Dovey SM. A randomized double blind controlled trial of roxithromycin and cefaclor in the treatment of acute lower respiratory tract infections in general practice. Diagn Microbiol Infect Dis 1992; 15 (supl 4): 97-101.

Tinghitella TJ, Edberg SC. Agglutination tests and Limulus assay for the diagnosis of infectious diseases. En: Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, eds. Manual of Clinical Microbiology 5th edn. American Society for Microbiology 1991: 61-73.

Torres A, De La Bellacasa JP, Xaubert A, Gonzalez J, Rodriguez-Roisin R, Jimenez de Anta MT et al. Diagnostic values of quantitative cultures of bronchoalveolar lavage and telescoping plugged catheters in mechanically ventilated patients with bacterial pneumonia. Am Rev Respir Dis 1989; 140: 306-310.

Torres A, Serra-Batlles J, Ferrer A, Jiménez P, Celis R, Cobo E et al. Severe community-acquired pneumonia. Epidemiology and prognostic factors. Am Rev Respir Dis 1991; 144: 312-318.

Tugwell P, Greenwood BM. Pneumococcal antigen in lobar pneumonia. J Clin Pathol 1975; 28: 118-123.

Valenti WM, Randall RG, Bentley DW. Factors predisposing to oropharyngeal colonization with gram-negative bacilli in the aged. N Eng J Med 1978; 298: 1108-1111.

Van der Auwera P, Andre A, Bulliard G, Legrand JC, Gordts B, Van Landuyt H et al. Comparison of latex agglutination and counterimmunoelectrophoresis in the diagnosis of Streptococcus pneumoniae infections. Eur J Clin Microbiol 1983; 2: 534-540.

Venkatesan P, Gladman J, Macfarlane JT, Barer D, Berman P, Kinnear W, Finch RG. A hospital study of community-acquired pneumonia in the elderly. Thorax 1990; 45: 254-258.

Venkatesan P, Macfarlane JT. Role of pneumococcal antigen in the diagnosis of pneumococcal pneumonia. Thorax 1992; 47: 329-331.

Verghese A, Berk SL. Bacterial pneumonia in the elderly. Medicine (Baltimore) 1983; 62: 271-85.

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.

Wallace AC. Clinical overview of typical Mycoplasma pneumoniae infections. Clin Infect Dis 1993; 17 (Suppl 1): S 32-6.

Wallace JM, Batra P, Gong H, Overfors CO. Percutaneous needle lung aspiration for diagnosing pneumocystis in the patient with acquired immunodeficiency syndrome. Am Rev Respir Dis 1985; 131: 389-392.

Wang SP, Grayston JT. Microimmunofluorescence serological studies with the TWAR organism. En Oriel JD, Ridgway G, Schacher J, Taylor-Robinson D, Warm M, eds. Chlamydial infections. Cambridge, Cambridge University Press, 1986; 329-332.

Wasser L, Talavera W. Pulmonary cryptococcosis in AIDS. Chest 1987; 92: 692-695.

Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953; 171: 737-738.

Weller PF, Smith AL, Smith DH, Anderson P. The role of immunity in the clearance of *H. influenzae* bacteriemia. *J Infect Dis* 1978; 138: 427-436.

Willians CA, Case MM eds. *Methods in immunology and immunochemistry.* Academic Press, Inc, New York 1970, vol 3: 1-125.

Woodhead MA, Arrowsmith J, Chamberlain-Webber R, Wooding S, Willians I. The value of routine microbial investigation in community-acquired pneumonia. *Respiratory Medicine*, 1991; 85: 313-317.

Woodhead MA, Macfarlane JT, Mc Cracken JS, Rose DH Finch RG. Prospective study of the aetiology and outcome of pneumonia in the community. *Lancet* 1987;; 671-674.

Woodhead MA, Macfarlane JT, Rodgers FG, Laverick A, Pilkington R, Macrae AR. Aetiology and outcome of severe community-acquired pneumonia. *J Infect* 1985; 10: 204-210.

Zalacaín R, Llorente JL, Gaztelurrutia L, Pijoan JI, Sobradillo V. Influence of three factors on the diagnostic effectiveness of transthoracic needle aspiration in pneumonia. *Chest* 1995; 107: 96-100.

Zavala DC, Schoell JE. Ultrathin needle aspiration of the lung in infectious and malignant disease. *Am Rev Respir Dis* 1981; 123: 125-131.

