

María Isabel Cameo*, María Antonia Lezcano, Sofía Samper y María José Revillo

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Miguel Server, Zaragoza, España

doi:10.1016/j.eimc.2009.10.003

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: micameo@salud.aragon.es (M.I. Cameo Rico).

Detección precoz y monitorización de *Legionella pneumophila* en muestras clínicas por PCR en tiempo real

Real-time PCR for early detection and monitoring of *Legionella pneumophila* in clinical specimens

Sr. Editor:

Legionella pneumophila es un bacilo gramnegativo perteneciente a la familia *Legionellaceae*, que incluye únicamente el género *Legionella*, el cual engloba 48 especies y más de 70 serogrupos. *L. pneumophila* origina más del 90% de las infecciones, siendo el serogrupo 1 el más frecuentemente aislado en pacientes (más del 80% de los casos confirmados)^{1,2}.

El cultivo en medio sólido buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar es la técnica diagnóstica de referencia y, aunque su sensibilidad es baja, posibilita tanto los estudios de epidemiología molecular como los estudios de susceptibilidad¹. El aislamiento en cultivo de este microorganismo presenta una serie de dificultades, como son la pérdida progresiva de viabilidad de la bacteria, el enmascaramiento de las colonias cuando se procesan muestras contaminadas con microbiota orofaríngea y el largo tiempo requerido para la obtención de los resultados susceptibilidad³. La inmunofluorescencia directa (IFD) permite detectar con rapidez la presencia de cualquier serogrupo de *L. pneumophila* en muestras clínicas y, aunque tiene una buena especificidad, su sensibilidad es muy baja (25-75%)³. Las pruebas serológicas presentan la limitación que supone detectar la seroconversión (se requieren al menos 9 semanas) después de haberse iniciado el cuadro clínico¹. La detección del antígeno en orina permite establecer el diagnóstico etiológico de forma casi inmediata en el 80-85% de los casos, aunque solo detecta el serogrupo 1⁴. La PCR en tiempo real permite realizar un diagnóstico directo muy sensible en menos de 2 h, y cuantificar el número de bacterias en la muestra³. Presentamos el caso de un paciente diagnosticado y monitorizado mediante PCR en tiempo real.

El paciente estudiado era una mujer de 69 años, inmunodeprimida, que ingresó en nuestro centro para resección de glioblastoma multiforme frontal. La placa de tórax, parámetros y analítica previos fueron normales. La paciente presentó fiebre intraoperatoria, por lo que se tomaron cultivos (aspirado bronquial tras intubación, esputo y urocultivo). Se realizó una placa de tórax en el postoperatorio inmediato, objetivándose un aumento de densidad bien delimitado en lóbulo medio. Se realizó antigenuria urgente de *L. pneumophila* y *Streptococcus pneumoniae* que fue positiva para *L. pneumophila*. El cultivo de aspirado bronquial fue positivo para *L. pneumophila* a los 21 días de incubación. Las pruebas serológicas fueron negativas. Se realizó PCR en tiempo real que detectaba el gen 16S codificante de ARNr, según el protocolo descrito por Reichl en 2002⁵ en el equipo LightCycler 2.0 (Roche, Mannheim, Alemania) de las muestras respiratorias, que fueron positivas. La paciente recibió tratamiento antimicrobiano endovenoso (azitromicina, piperacilina-tazobactam y levofloxacino) durante 5 días, y 9 días más de levofloxacino 500 mg/12 h vía oral para completar los 14 de tratamiento. Ante la mejoría clínica, recibió el alta. En febrero de 2009, la paciente ingresó de

nuevo por fiebre, astenia y deterioro del estado general, con neutropenia grado IV febril, por lo que se inició tratamiento antibiótico empírico con meropenem, levofloxacino y linezolid (tabla 1). Al ingreso, la paciente no podía expectorar, por lo que no fue posible obtener muestras respiratorias para cultivo. Se realizó la determinación de antígeno de *L. pneumophila* en orina, que fue positiva. Se recogió una muestra de suero para análisis serológico de *L. pneumophila*, que mostró unos títulos de IgG de 256 e IgM < 10. Se recogieron muestras de plasma cada 24-72 h hasta el día 33 de ingreso, día en que falleció. Se utilizaron dichas muestras de plasma para el estudio de la presencia de *L. pneumophila* mediante PCR en tiempo real (tabla 1).

El día 29 de ingreso, la paciente fue trasladada a UCI y se obtuvieron muestras de esputo y de aspirado bronquial, a partir de las cuales el cultivo y la PCR en tiempo real fueron positivos para *L. pneumophila* serogrupo 1. En los dos episodios de legionelosis se realizó aislamiento de *L. pneumophila* en cultivo de la muestra respiratoria, aunque la obtención de esta en el segundo evento se demoró aproximadamente un mes desde la fecha del ingreso, debido a que la paciente no podía expectorar. La PCR ARNr 16S de muestras de plasma permitió detectar el ADN hasta el día 15 de ingreso, de manera similar a lo descrito anteriormente por otros autores⁶. Los días posteriores se observó que la detección de ADN en plasma era fluctuante y cercana al límite de detección de la técnica, ya que la paciente continuaba infectada, como se pudo confirmar tras la obtención de las

Tabla 1

Seguimiento del segundo ingreso del paciente mediante PCR gen codificante ARNr 16S en muestras de plasma y respiratorias (en negrita tratamientos efectivos frente a *L. pneumophila*)

Muestra	Días ingreso	Copias/ml	Tratamiento
Plasma	5	+(471)	MEM, LEV , LNZ
Plasma	6	+(812)	MEM, LEV , LNZ
Plasma	7	+(493)	MEM, LEV , LNZ
Plasma	8	+(109)	MEM, LEV
Plasma	9	+(200)	MEM, LEV
Plasma	10	+(21)	MEM, LEV
Plasma	11	+(15)	MEM, LEV
Plasma	12	+(12)	MEM, LEV , TG
Plasma	13	+(20)	MEM, LEV , SXT
Plasma	14	+(19)	MEM, LEV , SXT
Plasma	15	+(11)	MEM, LEV , SXT
Plasma	16	Negativo	MEM, LEV , SXT
Plasma	18	+(18)	MEM, LEV , SXT
Plasma	22	Negativo	LEV , SXT
Plasma	23	Negativo	LEV , SXT
Plasma	26	+(9)	SXT
Plasma	27	Negativo	MEM, LEV , SXT
Plasma	28	Negativo	MEM, LEV , LNZ
Plasma	29	+(29)	MEM, LNZ
Esputo	29	+(820.000)	MEM, LNZ
Aspirado bronquial	29	+(6.410.000)	MEM, LNZ
Plasma	30	Negativo	MEM, LNZ
Plasma	31	Negativo	MEM, LNZ

LEV: levofloxacino; LNZ: linezolid; MEM: meropenem; SXT: cotrimoxazol; TG: tigeciclina.

muestras respiratorias días antes de fallecer. Se enviaron las cepas al Instituto de Salud Carlos III para tipificación por métodos moleculares. Los 2 aislamientos se trataban de la misma cepa de *L. pneumophila* serogrupo 1 serotipo Pontiac. Esto sugería que se trataba de una reactivación, aunque no se puede descartar una reinfección por la misma cepa.

El diagnóstico de laboratorio de la infección por *Legionella* spp., debería basarse en la detección del antígeno urinario combinado con una PCR en muestra respiratoria o plasma. Aunque el cultivo de muestras respiratorias es necesario para estudios epidemiológicos, esta podría ser la mejor estrategia diagnóstica inicial, que proporcionaría la máxima sensibilidad y especificidad para detectar *L. pneumophila*. Además, permitiría tener resultados en pocas horas que orientaría a un manejo clínico adecuado. Debido a que una vez iniciado el tratamiento antimicrobiano el cultivo de *L. pneumophila* puede ser negativo y a que la detección de antígeno en orina puede mantenerse positiva durante un año, la PCR a tiempo real se presenta como una posible herramienta para la monitorización de pacientes con legionelosis.

Bibliografía

1. Edelstein PH, Cianciotto NP. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editores. Principles and Practice of Infectious Diseases, 6 ed. Madrid: Elsevier; 2006. p. 2711-21.

doi:10.1016/j.eimc.2009.10.004

2. Uhl JR, Qian X, Hopkins MK, Aubry MC, Limper AH, Lloyd RV, et al. Direct detection of Legionella species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of LightCycler PCR, in situ hybridization, direct fluorescence antigen detection, and culture. J Clin Microbiol. 2001;39:2618-26.
3. Pelaz C. Diagnóstico microbiológico y control de la legionelosis. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica. <http://www.seimc.org/>.
4. Caylà JA. Consideraciones prácticas en la investigación de las legionelosis. Enfermedades Emergentes. 2000;2:200-1.
5. Reischl U, Linde HJ, Lehn N, Landt O, Barratt K, Wellinghausen N. Direct detection and differentiation of Legionella spp and Legionella pneumophila in clinical specimens by dual-color real-time PCR and melting curve analysis. J Clin Microbiol. 2002;40:3814-7.
6. Diederer BM, de Jong CM, Kluytmans JA, van der Zee A, Peeters MF. Detection and quantification of Legionella pneumophila DNA in serum: case reports and review of the literature. J Med Microbiol. 2006;55:639-42.

María Eugenia Portillo*, Gabriel Reina, Miriam Fernández-Alonso y José Leiva

Servicio de Microbiología Clínica, Clínica Universidad de Navarra, Pamplona, Navarra, España

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: meporillo@unav.es (M.E. Portillo).

Utilización del medio CHROMagar orientation en la detección de Streptococcus agalactiae en gestantes

Evaluation of chromagar orientation medium for the detection of streptococcus agalactiae in pregnant women

Sr. Editor:

Streptococcus agalactiae (estreptococo del grupo B [EGB]) es la causa más frecuente de infección neonatal precoz. La transmisión al recién nacido ocurre durante el parto, a partir de la colonización materna por EGB en vagina y/o recto¹. Esta colonización puede ser transitoria, crónica o intermitente, y afecta del 10 al 30% de las gestantes². En 2002, el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta (CDC) actualizó sus recomendaciones² para la prevención de la enfermedad perinatal por EGB. En nuestro laboratorio seguimos este protocolo.

Al introducir el medio CHROMagar orientation (CHR) en la rutina de urocultivos, observamos que las colonias de EGB mostraban una morfología típica (colonias pequeñas de color azul muy claro) y que eran fácilmente distinguibles en cultivos mixtos. Si bien este medio fue diseñado por el fabricante para la detección de patógenos urinarios habituales, quisimos evaluar la sensibilidad de este frente al medio de AGAR sangre (AS) en la detección de EGB. Durante un periodo de 6 meses (de febrero a julio de 2008) se realizó un estudio prospectivo de las muestras de mujeres gestantes (escobillones vaginales o rectovaginales) recibidas en nuestro laboratorio para estudio de colonización por EGB. El medio de transporte utilizado fue el Amies. Las muestras se sembraron en caldo Todd-Hewitt con gentamicina, ácido nalidíxico y sangre (S.M.B. broth, Biomerieux®) que tras incubación en atmósfera con un 5% de CO₂ durante 18 a 24 h a 37 °C, se subcultivaron en placas de medio AS de carnero (TSA-S:

Becton-Dickinson®) y en CHR (Becton-Dickinson®). A las 24 h de incubación cada medio de cultivo fue examinado por un observador diferente. La identificación de las colonias sospechosas de EGB (en AS: colonias beta hemolíticas y morfología típica, y en CHR: colonias pequeñas azul claro) se realizó mediante aglutinación (Slidex® Strepto Plus B: BioMérieux®). Al final del día se comparaban los resultados de ambos observadores y las discrepancias se resolvían con la identificación bioquímica mediante el sistema viteK 2 (Biomerieux®).

Se procesaron 1.003 muestras: 186 vaginales y 817 rectovaginales, pertenecientes a 1.003 mujeres. Se aisló EGB en 205 embarazadas, lo que supone un 20% de colonización. Del total de EGB detectados, 178 se aislaron en medio de AS y 194 en CHR (tabla 1). Lo que supone un porcentaje de colonización del 19,3% utilizando el medio CHR frente al 17,7% con el AS. Encontramos que el CHR tiene una sensibilidad del 94,6% frente al 86,8% del AS en la detección del EGB.

El porcentaje de colonización por EGB del 20% que encontramos es similar al descrito con anterioridad por otros autores^{1,3,5-7}. En el mercado hay una oferta muy amplia de medios de

Tabla 1
Recuperación de EGB según el medio de cultivo utilizado*

Agar sangre	CHROMagar orientation		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	167	11	178
Negativo	27	798	825
Total	194	809	1.003

* Sensibilidad AS: 178/205 (86,82%), CHR: 194/205 (94,6%).