



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Nuevos métodos para el diagnóstico microbiológico de la neumonía

Andrea Vergara Gómez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – CompartirIgual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – CompartirIgual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.**

Nuevos métodos para el diagnóstico microbiológico de la neumonía

Andrea Vergara Gómez

| 2021

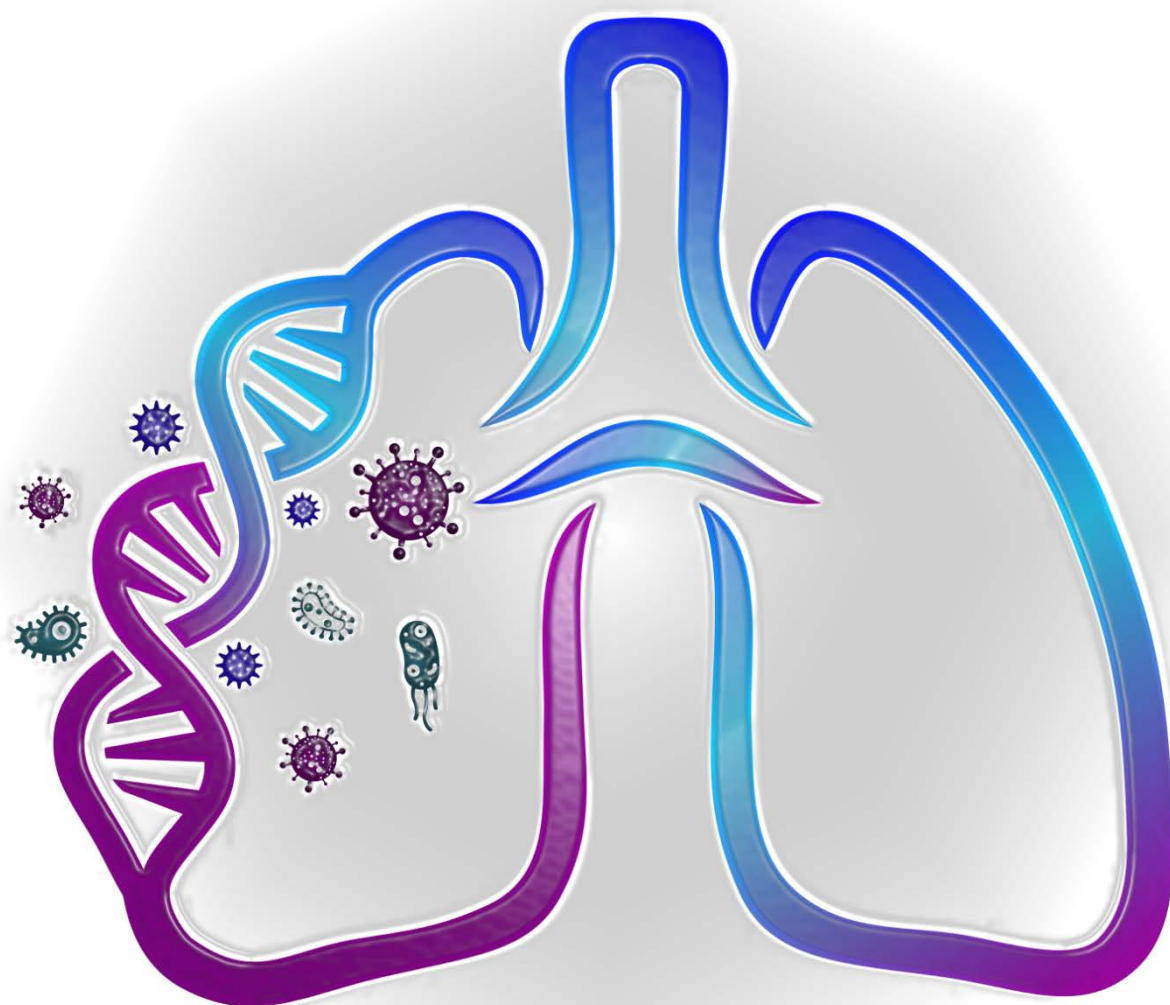


Imagen de la portada y contraportada: Sarai Llamas

Facultad de Medicina

Departamento de Fundamentos Clínicos

Programa de Doctorado en Medicina e Investigación Traslacional

Nuevos métodos para el diagnóstico microbiológico de la neumonía

Doctoranda: Andrea Vergara Gómez

Departamento de Fundamentos Clínicos

Instituto de Salud Global de Barcelona - Universidad de Barcelona - Hospital Clínic de Barcelona

Director de tesis: Dr. Jordi Vila Estapé

Departamento de Fundamentos Clínicos

Instituto de Salud Global de Barcelona - Universidad de Barcelona - Hospital Clínic de Barcelona

Barcelona, Abril 2021

El Dr. **JORDI VILA ESTAPÉ**, Catedrático del Departamento de Fundamentos Clínicos de la Universidad de Barcelona, Jefe del Servicio de Microbiología del Hospital Clínic de Barcelona y Profesor de Investigación y Director de la Iniciativa Resistencias Antimicrobianas del Instituto de Salud Global de Barcelona (ISGlobal),

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado **“Nuevos métodos para el diagnóstico microbiológico de la neumonía”**, presentado por **Andrea Vergara Gómez**, se ha realizado en el laboratorio de Microbiología del Hospital Clínic de Barcelona, bajo su dirección y cumple todos los requisitos necesarios para su tramitación y posterior defensa ante el Tribunal correspondiente.

Barcelona, Abril 2021

Andrea Vergara Gómez

Doctoranda

Dr. Jordi Vila Estapé

Director de la tesis doctoral

**“Nada en la vida debe ser temido, solamente comprendido.
Ahora es el momento de comprender más para temer menos”.**

- Marie Curie -

Agradecimientos

Esta tesis recoge no sólo una investigación, sino toda una etapa en mi vida.

Es parte de mis compañer@s de trabajo, much@s ya amig@s, que me han animado y empujado a seguir con ello hasta el final.

Es parte de la *Resistencia*, mi familia de Barcelona.

Es parte de mi director de tesis, que me ha enseñado tanto.

Es parte de mi hermano, que con un mínimo gesto es capaz de hacerme sentir feliz.

Es parte de mi familia y amig@s en Navarra, tan lejos y tan cerca al mismo tiempo.

Es parte de la *cuadrilla* de Barcelona, con los que los buenos ratos están asegurados.

Es parte de ti, Efrén, mi compañero de vida.

Pero, sobre todo, es parte de mis padres, sin los que hoy no estaría aquí. Ellos lo han dado todo para hacerlo posible, para hacerme llegar hasta aquí. Siempre dispuestos y siempre pendientes. No podrían ser mejores.

A tod@s,

GRACIAS

GRÀCIES

ESKERRIK ASKO

GRAZIE

Índice de contenidos

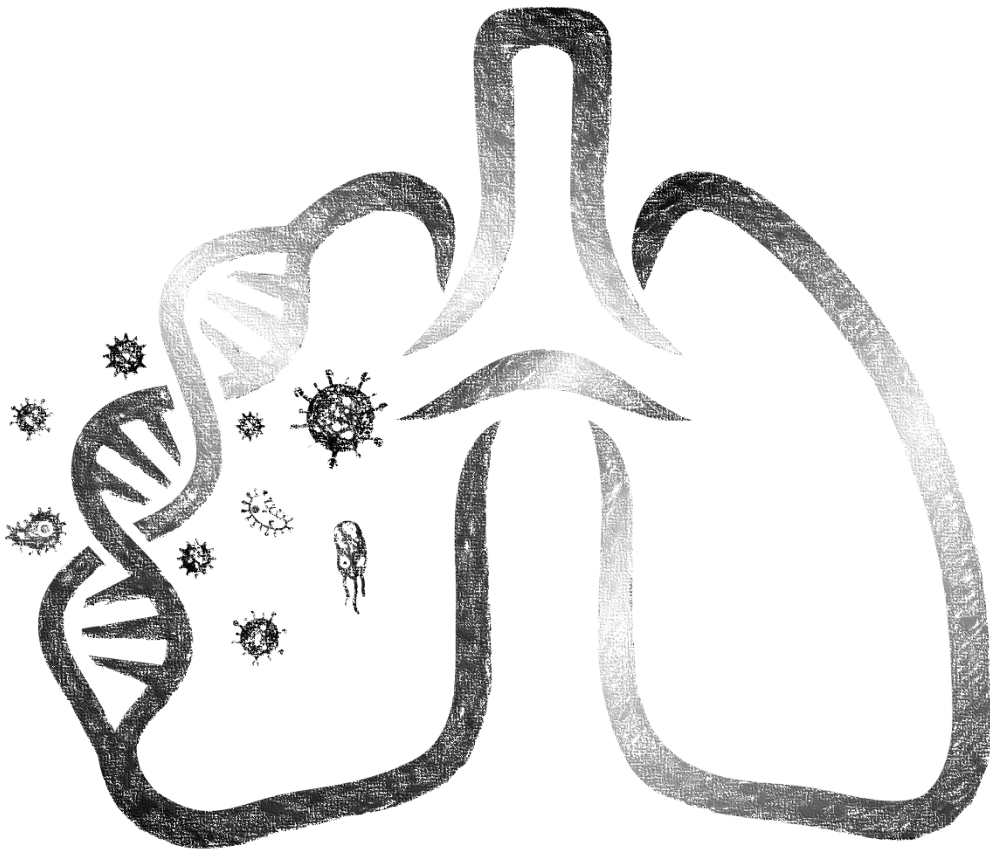
Resumen	19
Abstract	23
Producción científica	27
Abreviaturas	33
Índice de tablas	39
Índice de figuras	43
1. Introducción	47
1.1 Definición y clasificación de la neumonía	47
1.2 Epidemiología de la neumonía	48
1.3 Fisiopatología de la neumonía	50
1.4 Presentación clínica de la neumonía	52
1.5 Factores de riesgo de la neumonía	53
1.5.1 Factores de riesgo de la NAC	53
1.5.2 Factores de riesgo de la NIH	54
1.5.3 Factores de riesgo de la NAVM	54
1.6 Microbiota pulmonar	54
1.7 Etiología de la neumonía	57
1.7.1 Etiología de la NAC	57
1.7.2 Etiología de la NIH y NAVM	59
1.7.3 Resistencia antibiótica	61
1.8 Diagnóstico de la neumonía	69
1.8.1 Diagnóstico clínico y radiológico de la neumonía	70
1.8.2 Diagnóstico microbiológico de la neumonía	71

Índice de contenidos

1.8.3	Otras opciones diagnósticas	82
1.9	Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)	86
1.9.1	Fundamento de la LAMP	86
1.9.2	Variantes de LAMP	91
1.9.3	LAMP en el diagnóstico de la neumonía	93
1.10	Biomarcadores	95
1.10.1	Definición de biomarcador	95
1.10.2	Biomarcadores en el manejo de la neumonía	95
1.10.3	Lipocalina-2	97
2.	Justificación del trabajo e hipótesis	103
3.	Objetivos	107
4.	Resultados	111
	Diseño y evaluación de una LAMP para la identificación de las principales bacterias y virus implicados en la NIH/NAVIM directamente de muestras respiratorias.	111
	Artículo 1.	111
	Artículo 2.	125
	Artículo 3.	129
	Resultados adicionales 1.	135
	Evaluación de una técnica LAMP para la detección de beta-lactamasas en bacterias causantes de NIH/NAVIM.	151
	Artículo 4.	151
	Artículo 5.	157
	Artículo 6.	163
	Artículo 7.	169
	Evaluación de la LCN2 como biomarcador de neumonía.	177
	Resultados adicionales 2.	177
	Resultados adicionales 3.	181

5. Discusión	221
6. Conclusiones	243
7. Anexos	247
Anexo 1	247
Anexo 2	257
8. Referencias	269

RESUMEN



Resumen

La neumonía es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial y presenta una gran morbilidad asociada. El correcto diagnóstico de esta infección es crucial para el paciente y, en concreto, el diagnóstico microbiológico es esencial para asegurar un tratamiento antibiótico óptimo. Sin embargo, sólo se consigue determinar la etiología en la mitad de los casos aproximadamente, lo que conlleva un tratamiento inadecuado en muchos casos. Por ello, es necesario el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas que permitan un diagnóstico rápido y adecuado de la neumonía.

Los objetivos de esta tesis son diseñar y evaluar ensayos basados en la técnica de amplificación de tipo LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*) para la identificación de las principales bacterias y virus implicados en la neumonía intrahospitalaria (NIH), incluida la asociada a la ventilación mecánica (NAVIM), diseñar y evaluar ensayos basados en la técnica de amplificación de tipo LAMP para la detección de genes de resistencia a antibióticos β -lactámicos en estas bacterias, y evaluar la lipocalina-2 (LCN2) como biomarcador de neumonía.

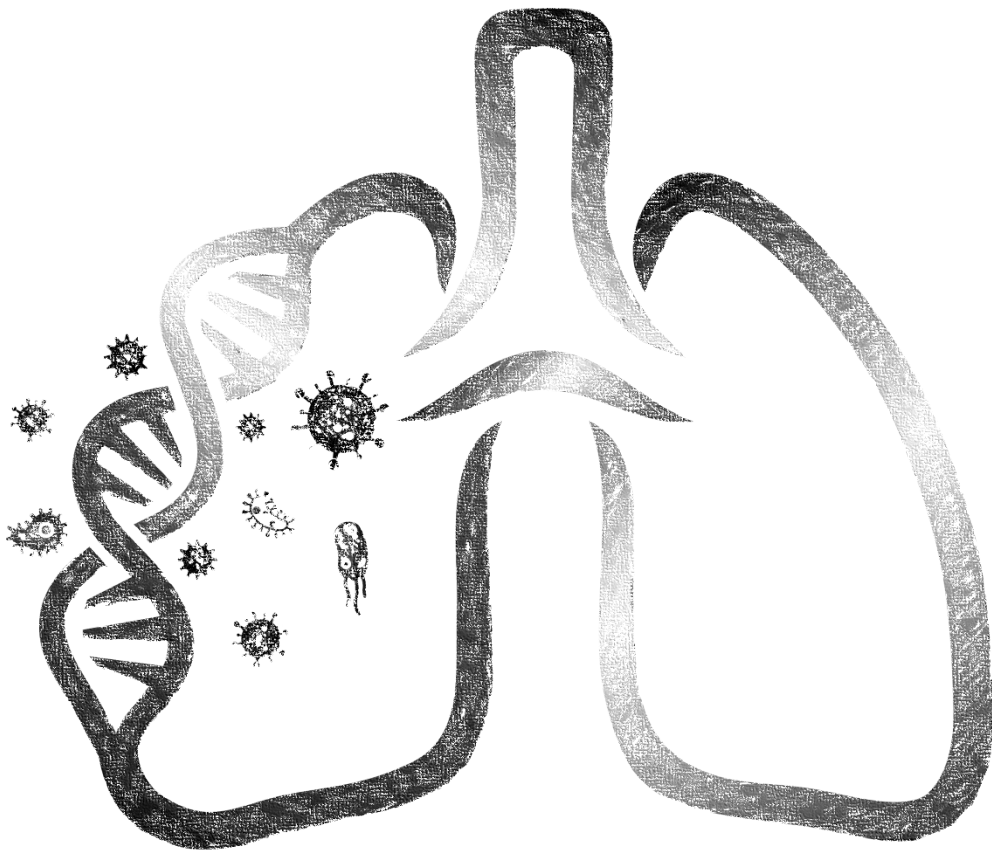
Para cubrir el primer objetivo, se desarrolló y evaluó una LAMP para detectar *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Acinetobacter baumannii* a partir del ADN extraído mediante un método rápido de muestras de lavado broncoalveolar (LBA), aspirado traqueal (AT) y broncoaspirado (BAS). Además, se desarrolló y evaluó una LAMP para la detección del virus herpes simple-1 (VHS-1) a partir de LBA con y sin extracción de ADN. Por último, se evaluó el papel del citomegalovirus (CMV) en LBA de pacientes críticos y se desarrolló y evaluó una LAMP para su detección. En cuanto al segundo objetivo, se evaluó una LAMP comercial para la detección de genes de resistencia a antibióticos β -lactámicos en *Enterobacterales* y *Acinetobacter* spp. tanto a partir de cepas como de muestras respiratorias. Finalmente, como parte del tercer objetivo, se evaluó la utilidad de la LCN2 en plasma y LBA para el diagnóstico de NAVIM en un modelo animal porcino. Además, se evaluó

la utilidad de la concentración plasmática de LCN2 para determinar la etiología (bacteriana frente a no bacteriana), gravedad y pronóstico de pacientes adultos con neumonía adquirida en la comunidad (NAC) admitidos en Urgencias.

La técnica LAMP presentó una elevada sensibilidad y especificidad para detectar los principales microorganismos causantes de NIH (bacterias y virus) de forma barata, rápida, sensible y específica. El sistema comercial basado en LAMP evaluado demostró ser una buena herramienta para la detección de diferentes genes de resistencia a antibióticos β -lactámicos en *Enterobacteriales* así como en *Acinetobacter* spp. con un tiempo de respuesta rápido. En condiciones de alta concentración de bacterias, el método LAMP presentó buenos resultados cuando se realizó sin un paso previo de extracción de los ácidos nucleicos, reduciendo el tiempo de respuesta. Por otro lado, se observó un aumento de los niveles de LCN2 en los animales que desarrollaban NAVM, especialmente marcado en el LBA. La capacidad de la LCN2 como biomarcador para discriminar la etiología de la NAC fue limitada, pero la concentración de LCN2 se asoció con la gravedad y el ingreso en la Unidad de Cuidados Intensivos en pacientes adultos con NAC.

Los trabajos incluidos en esta tesis doctoral podrían contribuir a la mejora del diagnóstico precoz, manejo e identificación de especies causantes de neumonía y, por tanto, al tratamiento óptimo que permitiría la reducción de la morbi-mortalidad asociada.

ABSTRACT



Abstract

Pneumonia is one of the leading causes of mortality worldwide and has a great associated morbidity. The correct diagnosis of this infection is crucial for the patient and, in particular, the microbiological diagnosis is essential to ensure optimal antibiotic treatment. However, etiology is only known in approximately half of the cases, which leads to inadequate treatment in many cases. Therefore, the development of new diagnostic techniques that allow a rapid and adequate diagnosis of pneumonia is necessary.

The objectives of this thesis are to design and evaluate assays based on an isothermal amplification method, LAMP (Loop-Mediated isothermal Amplification), for the identification of the main bacteria and viruses causing hospital-acquired pneumonia (HAP), including ventilation-associated pneumonia (VAP), to evaluate commercial assays based on LAMP for the detection of β -lactam antibiotic resistance genes in these bacteria, and to evaluate lipocalin-2 (LCN2) as a biomarker of pneumonia.

To meet the first objective, a LAMP was developed and evaluated to detect *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Acinetobacter baumannii* from bronchoalveolar lavage samples (LBA), tracheal aspirate (AT) and bronchial aspirate (BAS), after a rapid extraction of DNA. In addition, a LAMP was developed and evaluated for the detection of herpes simplex virus-1 (HSV-1) from BAL with and without DNA extraction. Finally, the role of cytomegalovirus (CMV) in BAL in critically ill patients was evaluated and a LAMP was developed and evaluated for its detection. Regarding the second objective, a commercial LAMP was evaluated for the detection of resistance genes to β -lactam antibiotics in *Enterobacterales* and *Acinetobacter* spp. both from strains and from respiratory samples. Finally, as part of the third objective, the usefulness of LCN2 in plasma and BAL for the diagnosis of NAVM in a porcine animal model was evaluated. In addition, the usefulness of the plasma concentration of LCN2 was evaluated to determine the etiology (bacterial *versus*

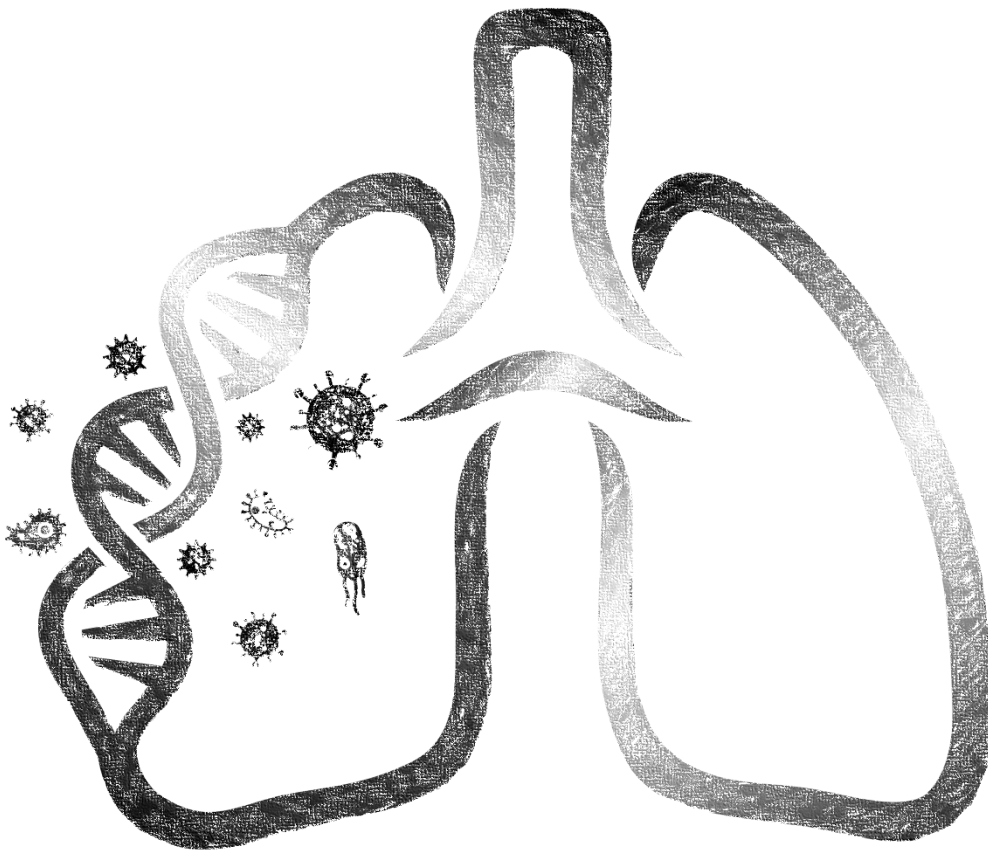
Abstract

non-bacterial), severity and prognosis of adult patients with community-acquired pneumonia (CAP) admitted to the emergency department.

The LAMP technique presented high sensitivity and specificity to detect the main microorganisms causing HAP (bacteria and viruses) in a cheap, quick, sensitive and specific way. The commercial LAMP-based system evaluated proved to be a good tool for the detection of different β -lactam antibiotics resistance genes in *Enterobacteriales* as well as in *Acinetobacter* spp. with a short response time. Under conditions of high concentration of bacteria, the LAMP method presented good results when it was performed without a previous DNA extraction step, reducing the response time. On the other hand, an increase in LCN2 levels, especially marked in BAL, was observed in animals that developed NAVM. The ability of LCN2 as a biomarker to discriminate the etiology of CAP was limited, but the concentration of LCN2 was associated with severity and admission to the Intensive Care Unit in adult patients with CAP.

The research included in this thesis could contribute to the improvement of the early diagnosis, management and identification of species that cause pneumonia and, therefore, to the optimal treatment that would allow the reduction of the associated morbidity and mortality.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA



Producción científica

Los resultados de esta tesis han sido publicados en revistas científicas y presentados en congresos nacionales e internacionales.

Publicaciones en revistas indexadas:

1. **Vergara A**, Moreno-Morales J, Roca I, Pitart C, Kostyanev T, Rodríguez-Baño J, Goossens H, Marco F, Vila J. A comparative study between Real-time PCR and LAMP to detect carbapenemase and/or extended-spectrum- β -lactamase genes in *Enterobacteriaceae* directly from bronchoalveolar lavage fluid samples. *J Antimicrob Chemother* 2020; 75: 1453-1457. doi:10.1093/jac/dkaa031. Impact factor: **5.439 - Q1** (2019).
2. **Vergara A**, Boutal H, Ceccato A, López M, Cruells A, Bueno-Freire L, Moreno-Morales J, Puig de la Bellacasa J, Castro P, Torres A, Marco F, Casals-Pascual C, Vila J. Assessment of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid detection of pathogenic bacteria from respiratory samples in patients with hospital-acquired pneumonia. *Microorganisms* 2020; 8: 103. doi: 10.3390/microorganisms8010103. Impact factor: **4.152 - Q2** (2019).
3. Moreno-Morales J, **Vergara A**, Kostyanev T, Rodríguez-Baño J, Goossens H, Vila J. Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification assay to detect carbapenemases from *Acinetobacter* spp. directly from bronchoalveolar lavage fluid. *Front Microbiol* 2021; 11: 597684. doi: 10.3389/fmicb.2020.597684. Impact factor: **4.236 - Q1** (2019).
4. **Vergara A**, Vendrell R, Alejo-Cancho I, Rodríguez C, Vila J, Marcos MA. Rapid detection of herpes simplex virus-1 from bronchoalveolar lavage fluids using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Enferm Infecc Microb Clin* 2019; 37 (5): 353-354. doi: 10.1016/j.eimc.2018.10.008. Impact factor: **1.654 - Q4** (2019).

5. **Vergara A**, Cilloniz C, Luque N, García-Vidal C, Tejero J, Perelló R, Lucena CM, Torres A, Marcos MA. Detection of human cytomegalovirus in bronchoalveolar lavage of intensive care unit patients. *Eur Respir J* 2018; 51: 1701332. doi: 10.1183/13993003.01332-2017. Impact factor: **11.807 - Q1, D1** (2018).
6. Vila J, Zboromyrska Y, **Vergara A**, Alejo-Cancho I, Rubio E, Álvarez-Martínez MJ, Puig de la Bellacasa J, Marcos MA. Métodos moleculares de diagnóstico de infecciones respiratorias. ¿Ha cambiado el esquema diagnóstico? *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2016; 34 (3): 40-46. doi: 10.1016/S0213-005X(16)30218-X. Impact factor: **1.714 - Q4** (2016).
7. García-Fernández S, Morosini MI, Marco F, Gijón D, **Vergara A**, Vila J, Ruiz-Garbajosa P, Cantón R. Evaluation of the eazyplex® Superbug CRE system for rapid detection of carbapenemases and extended-spectrum β -lactamases in clinical *Enterobacteriaceae* isolates recovered at two Spanish hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70 (4): 1047-1050. doi: 10.1093/jac/dku476. Impact factor: **4.919 - Q1** (2015).
8. **Vergara A**, Zboromyrska Y, Mosqueda N, Morosini MI, García-Fernández S, Roca I, Cantón R, Marco F, Vila J. 2014. Evaluation of a Loop-mediated isothermal amplification-based methodology (EazyplexR) to detect carbapenemase-carriage in *Acinetobacter* spp. clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58 (12): 7538-7540. doi: 10.1128/AAC.03870-14. Impact factor: **4.476 - Q1** (2014).

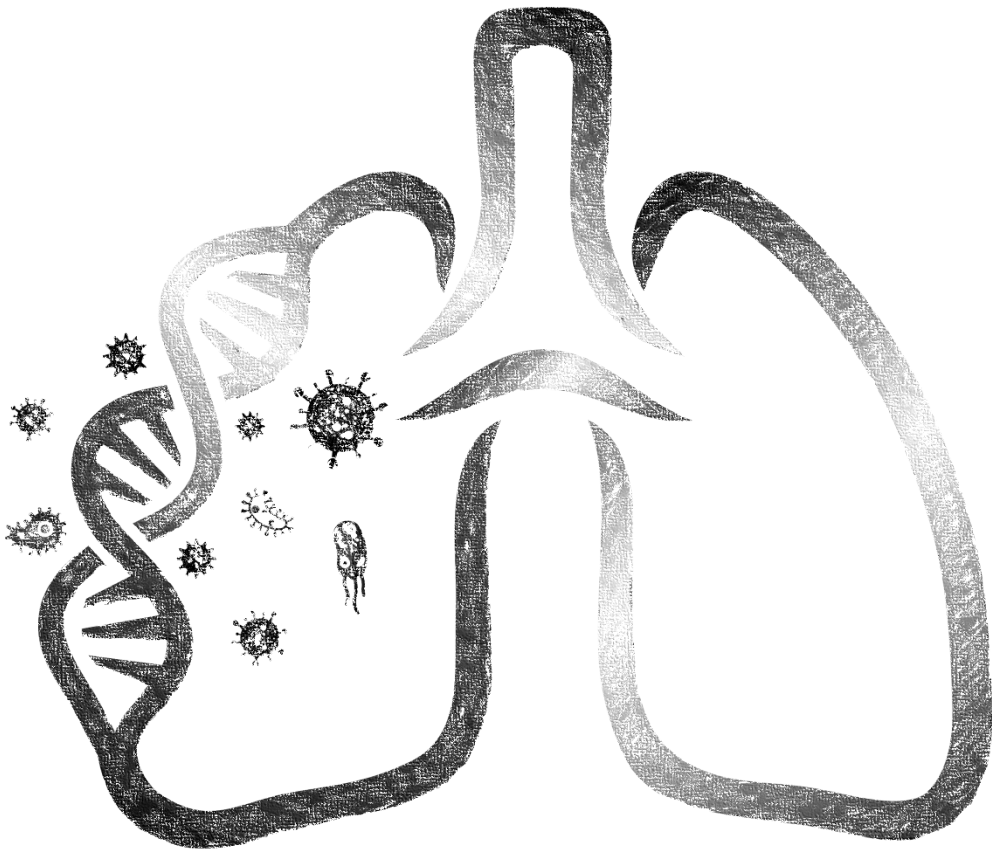
Manuscritos pendientes de publicación:

1. **Vergara A**, Alejo-Cancho I, Cervilla A, Navarro M, Rodríguez C, Vila J, Marcos MA. Evaluation of a LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) assay to detect cytomegalovirus in bronchoalveolar lavages from critically ill patients. Manuscrito en preparación.
2. **Vergara A**, Boix L, Padilla E, Martínez D, Calbo E, Blanco A, Pérez J, Vila J, Casals-Pascual C. Evaluation of Plasma Lipocalin-2 as a Predictor for Etiology, Severity and Prognosis of Adult Patients with Community-Acquired Pneumonia. Manuscrito en preparación.

Comunicaciones a congresos:

1. **Vergara A**, Boix L, Padilla E, Calbo E, Blanco A, Pérez J, Vila J, Casals-Pascual C. Evaluation of plasma lipocalin-2 as a biomarker of community-acquired pneumonia. 30th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Paris 2020.
2. Moreno-Morales J, **Vergara A**, Vila J. Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification assay to detect Extended-Spectrum beta-Lactamase and/or Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter* directly from bronchoalveolar lavage fluid. 29th ECCMID. Ámsterdam 2019.
3. **Vergara A**, Casals-Pascual C, Motos A, Fernández-Barat L, Torres A, Vila J. Evaluación de la lipocalina-2 como biomarcador de neumonía asociada a ventilación mecánica en un modelo animal. XXIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Madrid 2019.
4. **Vergara A**, Boix L, Martínez D, Padilla E, Calbo E, Pérez J, Casals-Pascual C, Vila J. Evaluación de la lipocalina-2 en plasma como biomarcador de neumonía adquirida en la comunidad bacteriana frente vírica. XXIII Congreso de la SEIMC. Madrid 2019.
5. **Vergara A**, Cruells A, López M, Puig de la Bellacasa J, Marco F, Vila J. Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid detection of pathogenic bacteria in bronchoalveolar lavage specimens. 28th ECCMID. Madrid 2018.
6. **Vergara A**, Vendrell R, Alejo I, Cruells A, Cervilla A, Rodríguez C, Vila J, Marcos MA. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) como técnica de detección del virus herpes simple en lavado broncoalveolar. XXII Congreso de la SEIMC. Bilbao 2018.
7. **Vergara A**, Alejo I, Cervilla A, Navarro M, Rodríguez C, Vila J, Marcos MA. Evaluation of a LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) assay as a screening tool to detect CMV in critically ill patients. 27th ECCMID. Viena 2017.
8. **Vergara A**, Cilloniz C, Tejero J, Cervilla A, Alejo I, Lucena C, Rubio E, Fasanella A, Torres A, Marcos MA. Detección de citomegalovirus en lavados broncoalveolares de pacientes críticos. XX Congreso de la SEIMC. Barcelona 2016.

ABREVIATURAS



Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AT	Aspirado traqueal
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
BAS	Broncoaspirado
BIP	<i>Backward inner primer</i>
BLEE	β-lactamasa de espectro extendido
B3	<i>Backward outer primer</i>
CMV	Citomegaluvirus
CRP	Proteína C reactiva (se mantiene el acrónimo en inglés para distinguirlo de la PCR)
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CURB-65	<i>Confusion, urea, respiratory rate and blood pressure, age ≥65 years</i>
dLAMP	LAMP digital
dPCR	PCR digital

Abreviaturas

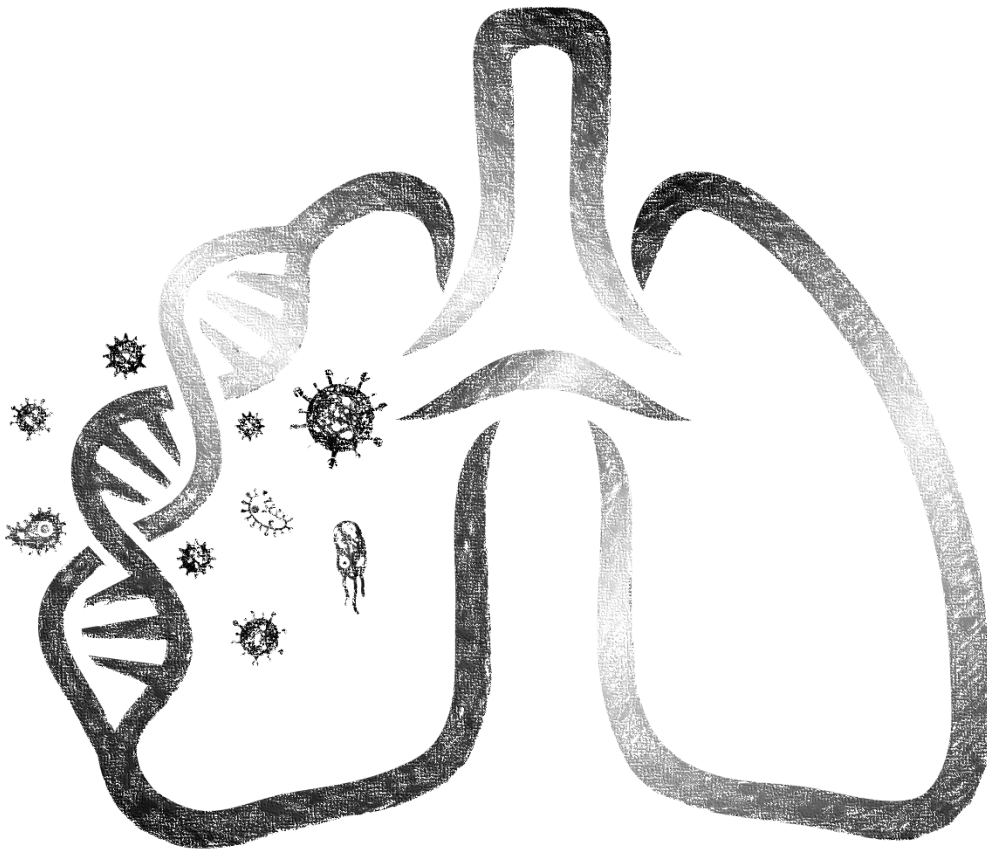
ECDC	<i>European Center for Disease Prevention and Control</i>
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ENVIN	Encuesta nacional de vigilancia de infección nosocomial
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
FIP	<i>Forward inner primer</i>
F3	<i>Forward outer primer</i>
IDSA	<i>Infectious Diseases Society of America</i>
IL	Interleucina
LAMP	<i>Loop-mediated isothermal amplification</i>
LB	<i>Loop backward primer</i>
LBA	Lavado broncoalveolar
LCN2	Lipocalina-2
LF	<i>Loop forward primer</i>
LFD	<i>Lateral flow device</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry</i>
MDR	<i>Multidrug resistant</i>

mLAMP	LAMP multiplex
NAC	Neumonía adquirida en la comunidad
NAVM	Neumonía asociada a la ventilación mecánica
NGS	<i>Next-generation sequencing</i>
NIH	Neumonía intrahospitalaria
PBP	<i>Penicillin-binding protein</i>
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
PCT	Procalcitonina
PDR	<i>Pandrug resistant</i>
POC	<i>Point-of-care</i>
PSI	<i>Pneumonia severity index</i>
qLAMP	LAMP cuantitativa
qPCR	PCR cuantitativa
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
SARS	Síndrome respiratorio agudo severo
TNF	Factor de necrosis tumoral
TDR	Técnica de diagnóstico rápido

Abreviaturas

UCI	Unidad de cuidados intensivos
UFC	Unidad formadora de colonias
VHS	Virus herpes simple
VRS	Virus respiratorio sincitial
XDR	Extremadamente resistente

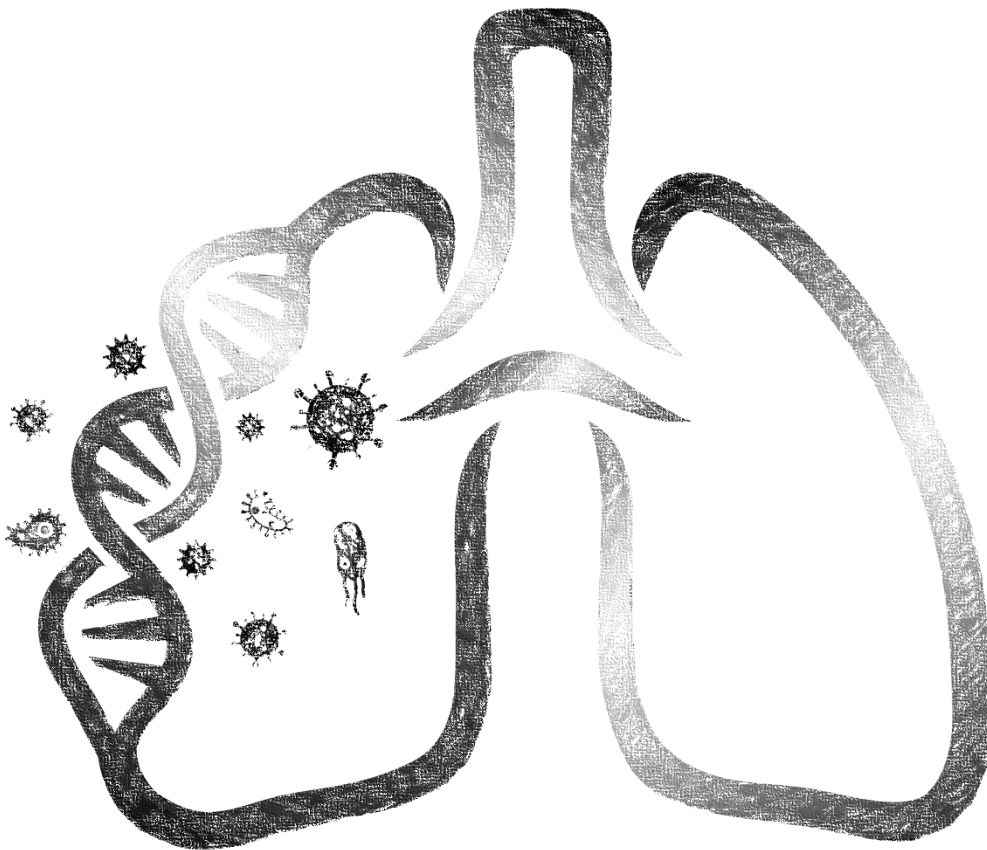
ÍNDICE DE TABLAS



Índice de tablas

Tabla 1. Principales microorganismos causantes de neumonía en pacientes inmunocompetentes. _____	58
Tabla 2. Principales β -lactamasas clínicamente relevantes. _____	63
Tabla 3. Comparación de métodos moleculares comerciales para el diagnóstico de infecciones respiratorias. _____	76
Tabla 4. Ventajas y desventajas del cultivo convencional y las técnicas moleculares. _____	80
Tabla 5. Resumen de las características de los métodos de amplificación isotérmica más empleados. _____	85
Tabla 6. Comparación de métodos de detección de amplificación para LAMP. _____	89
Tabla 7. Concentración de lipocalina-2 en los distintos grupos y tiempos de recogida de muestras. _____	179

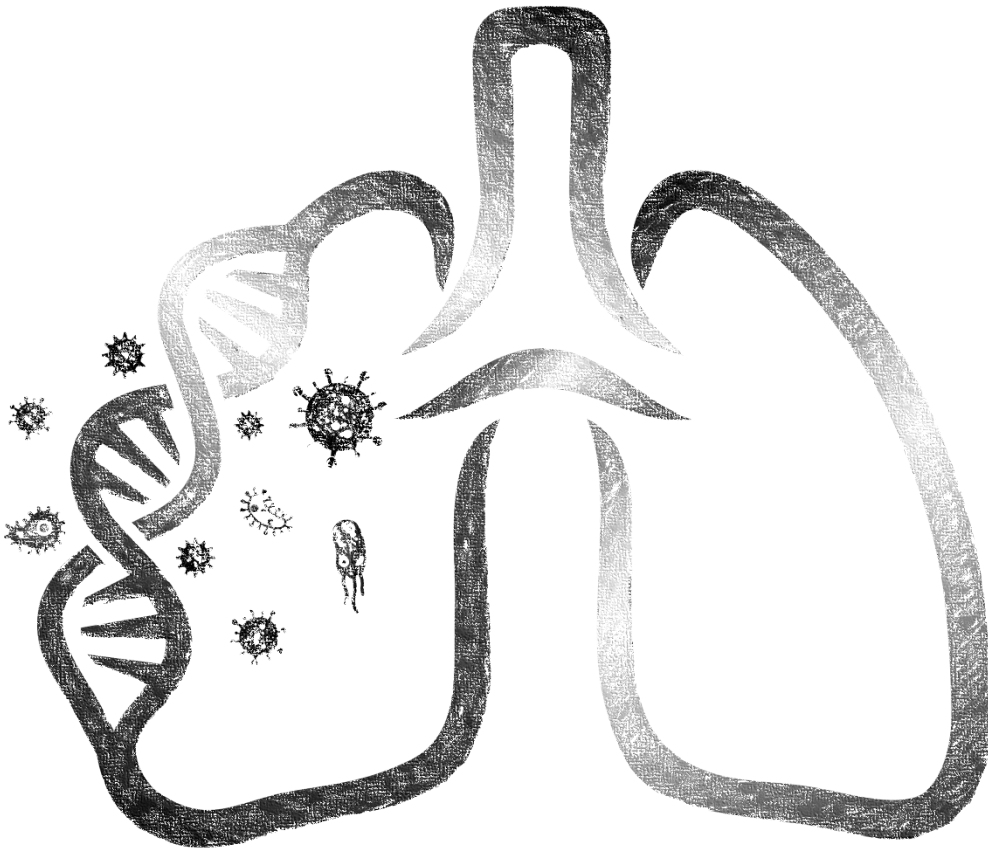
ÍNDICE DE FIGURAS



Índice de figuras

Figura 1. Causas principales de defunción en el mundo. _____	48
Figura 2. Evolución en el tiempo del porcentaje de resistencia a cefalosporinas de tercera generación en aislamientos de <i>E. coli</i> entre 2002 (A), 2010 (B) y 2018 (C) en los países que participan en el sistema de vigilancia europeo. _____	64
Figura 3. Evolución en el tiempo del porcentaje de resistencia a cefalosporinas de tercera generación en aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> entre 2005 (A), 2012 (B) y 2018 (C) en los países que participan en el sistema de vigilancia europeo. _____	65
Figura 4. Pilares sobre los que se sustenta el diagnóstico de la neumonía. _____	69
Figura 5. Mecanismo del método LAMP. _____	88
Figura 6. Instrumento Genie II (Optigene): detector de fluorescencia a tiempo real con dos módulos para el procesamiento de dos muestras al mismo tiempo. _____	92
Figura 7. Número de registros en Pubmed desde el año 2000 hasta el año 2020 para “Loop-mediated isothermal amplification”. _____	94
Figura 8. Papel de la lipocalina-2 ante una infección. _____	98
Figura 9. Posición del animal en el modelo de neumonía asociada a ventilación mecánica en cerdos. _____	178
Figura 10. Flujo de trabajo en el diagnóstico microbiológico de la neumonía. _____	235
Figura 11. Implementación de las técnicas rápidas de diagnóstico de enfermedades infecciosas en el ámbito clínico para optimizar el diagnóstico y la administración de antimicrobianos. _____	238

INTRODUCCIÓN



1. Introducción

1.1 Definición y clasificación de la neumonía

Las infecciones del tracto respiratorio inferior son muy frecuentes, tanto las adquiridas en la comunidad como las nosocomiales. Dentro de estas infecciones, destaca la neumonía. La palabra “neumonía” se origina de la antigua palabra griega “pneumon” que significa “pulmón”, por lo que la palabra “neumonía” se correspondería con “enfermedad pulmonar”. Se trata de una inflamación del parénquima de uno o ambos pulmones que generalmente está causada por infecciones. Pueden estar implicados tanto bacterias, virus, hongos como parásitos (1).

Para facilitar la elección del tratamiento empírico y la interpretación de los hallazgos microbiológicos, la neumonía se clasifica en tres grupos según parámetros clínicos y epidemiológicos, así como según los microorganismos más frecuentemente implicados:

- **Neumonía adquirida en la comunidad (NAC):** Infección aguda del tejido pulmonar no adquirida en el ambiente hospitalario.
- **Neumonía intrahospitalaria o nosocomial (NIH):** Infección aguda del tejido pulmonar que se desarrolla 48 horas o más después de la hospitalización de un paciente no intubado.
- **Neumonía asociada a la ventilación mecánica (NAVVM):** Un tipo de NIH que se desarrolla 48 horas o más después de la intubación para someter al paciente a ventilación mecánica.

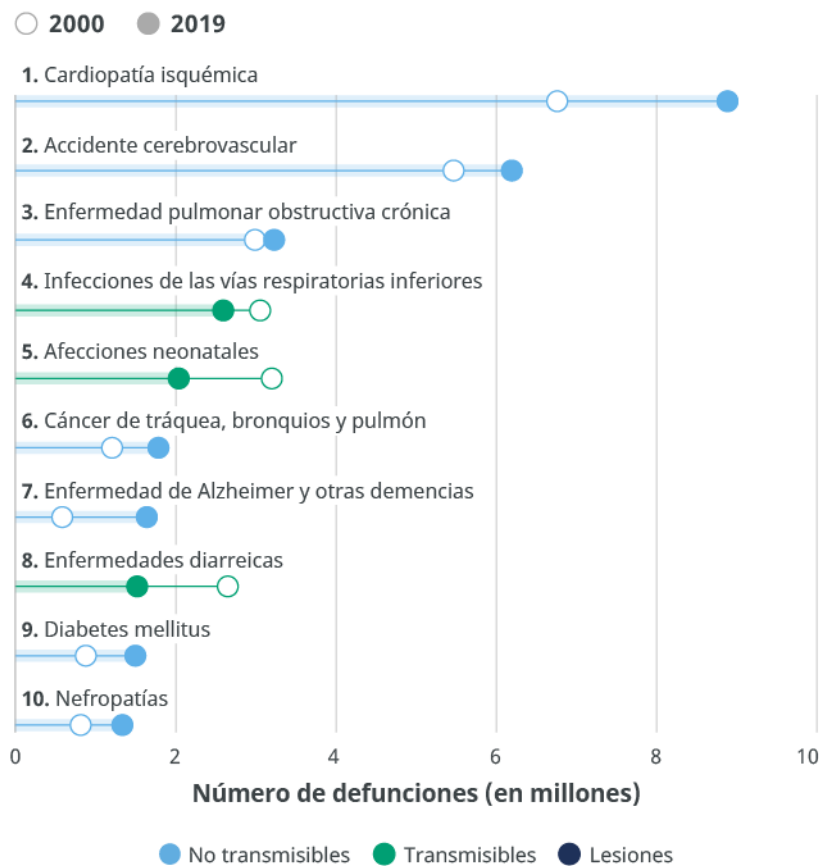
Hasta hace unos años, se contemplaba un cuarto tipo de neumonía, la neumonía asociada a cuidados sanitarios: neumonía adquirida en entornos de atención médica como residencias de ancianos y centros de diálisis (2,3). Sin embargo, se recomendó abandonar este concepto en la guía de 2019 de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (IDSA, del inglés “Infectious Diseases Society of America”) y de la Sociedad Torácica de América (ATS, del inglés “American Thoracic Society”) (4). Ahora se sabe que los pacientes

que adquieren neumonía en entornos de atención médica no tiene mayor riesgo de patógenos multirresistentes ni de mortalidad, sino que la etiología es comparable a la de la NAC (5,6).

1.2 Epidemiología de la neumonía

A nivel mundial, las infecciones del tracto respiratorio inferior se sitúan como la cuarta causa de muerte (**Figura 1**). Si nos centramos en países de baja renta, son la segunda causa de muerte; y en el caso de países de alta renta, la quinta causa, representando además la causa de muerte por infección más frecuente (7).

Figura 1. Causas principales de defunción en el mundo. Fuente: WHO Global Health Estimates (7).



Los números reales a nivel global son difíciles de determinar, ya que el diagnóstico no siempre es fácil y no siempre es posible disponer de las herramientas necesarias en todos los lugares. Sin embargo, se estima que las infecciones agudas del sistema respiratorio causan unos tres millones de muertes anuales, siendo un tercio de estos muertos niños menores de cinco años, suponiendo la principal causa de muerte en este grupo de población (8,9). En 2017, las tasas de mortalidad por neumonía más altas se dieron en los individuos con ≥ 70 años: 261/100 000 personas murieron debido a una neumonía en esta franja de edad (10).

La incidencia anual de NAC se sitúa entre el 5 y el 11% de los adultos, siendo más frecuente entre los hombres, en edades extremas, en invierno y en presencia de diversos factores de riesgo, que se describirán posteriormente. En Europa, la incidencia de la NAC es de 1,5-1,7 casos por 1 000 habitantes/año (11); en España, de 2-10 casos por 1 000 habitantes/año, ascendiendo a 25-35 casos por 1 000 en mayores de 70 años (12,13). El número de ingresos por NAC varía entre 1,1 y 4 por 1 000 pacientes, dependiendo de los países (11). Por otro lado, entre un 1,2 y un 10% de pacientes hospitalizados por NAC precisan ingreso en UCI (14). La mortalidad de la NAC puede oscilar del 1-5% en los pacientes ambulatorios y 5,7-14% en los pacientes hospitalizados, ascendiendo al 34-50% en los pacientes en la unidad de cuidados intensivos (UCI), especialmente en aquellos que precisan ventilación mecánica. La mortalidad a medio y largo plazo es elevada (8% a los 90 días, 21% al año y 36% a los 5 años) (14).

Por otro lado, la NIH es una de las principales causas de infección hospitalaria, con tasas del 10-20% (5-10 casos/1 000 hospitalizaciones) en pacientes sin ventilación mecánica y tasas hasta 20 veces superiores en pacientes ventilados (15). Por su parte, la NAVM es la primera causa de infección en los pacientes con ventilación mecánica, con una morbi-mortalidad asociadas muy elevadas (16). El riesgo de desarrollar neumonía en los pacientes intubados es entre 6-21 veces superior que en los no intubados, y este riesgo aumenta en un 1-3% conforme avanza el número de días con ventilación mecánica. Aproximadamente un tercio de las NIH, la mayoría NAVM, se adquieren en las UCIs (17). La NAVM supone aproximadamente el 30% de las infecciones adquiridas en la UCI (18), con unos 5 casos por 1 000 días de ventilación mecánica y unos 4 casos por cada 100 pacientes con ventilación

mecánica. De hecho, es la principal causa de infección en las UCIs españolas. La mortalidad reportada en pacientes con NAVM está entre un 20-50%, aunque la mortalidad directamente asociada a la NAVM parece ser menor, en torno al 13% (19). Por otro lado, la NAVM se asocia a periodos de ventilación mecánica y de hospitalización más prolongados, así como a un elevado coste sanitario (19).

1.3 Fisiopatología de la neumonía

Patógenos como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* o bacilos Gram-negativos alcanzan las vías respiratorias bajas por aspiración de secreciones orofaríngeas; otros lo hacen mediante inhalación. Normalmente, estas microaspiraciones o inhalaciones no van más allá y la progresión a neumonía es rara. Esta progresión depende de numerosos factores relacionados tanto con el patógeno (inóculo, virulencia), como con el huésped (comorbilidades, estado inmunitario) (20). En condiciones normales, existe un equilibrio entre los microorganismos que colonizan el tracto respiratorio inferior y el sistema inmune (innato y adquirido) del huésped. Alteraciones en estos mecanismos de defensa pueden conducir a la inflamación del parénquima pulmonar (neumonía) (21):

- Inmunidad celular alterada
- Aclaramiento mucociliar alterado
- Problemas en el reflejo de la tos
- Acumulación de secreciones

Los macrófagos que residen en las vías respiratorias inferiores protegen al pulmón frente patógenos extraños. Sin embargo, la reacción inflamatoria provocada por estos mismos macrófagos es la responsable de los hallazgos histopatológicos y clínicos observados en la neumonía. Los macrófagos fagocitan estos patógenos y liberan una serie de citocinas, como el factor de necrosis tumoral (TNF) α , la interleucina (IL) -8 y la IL-1, que reclutan células inflamatorias como los neutrófilos hasta el lugar de la infección. Además, son los encargados de presentar los antígenos a los linfocitos T que desencadenarán mecanismos de

defensa tanto celulares como humorales, activando al complemento y colaborando con los linfocitos para formar anticuerpos contra estos microorganismos. Esto, a su vez, causa inflamación del parénquima pulmonar y una congestión exudativa.

En el caso concreto de la NIH, se adquiere a través de tres mecanismos: aspiración, inhalación de aerosoles o diseminación hematógena a partir de otro foco. El mecanismo más frecuente es la microaspiración de bacterias que colonizan la orofaringe y/o estómago. La microbiota orofaríngea está formada principalmente por cocos Gram-positivos. La colonización de la orofaringe por bacilos Gram-negativos se observa en menos del 10% de los individuos sanos, aumentando con hospitalizaciones prolongadas y alcanzando hasta el 60-75% en pacientes de UCI (12). En condiciones normales, la orofaringe está recubierta por fibronectina que favorece la adhesión de bacterias Gram-positivas a la mucosa (15). Sin embargo, los pacientes críticos presentan un aumento de la actividad proteasa, lo que disminuye tanto las concentraciones de fibronectina como de inmunoglobulina A en la mucosa. Esto favorece la adhesión de bacterias Gram-negativas en detrimento de las Gram-positivas. Por otro lado, el uso de antibióticos favorece la selección de este tipo de bacterias y, especialmente, de las bacterias resistentes a los antibióticos (22). La alteración o abolición de los mecanismos de defensa del tracto respiratorio de tipo mecánico (epitelio ciliado y moco), humoral (anticuerpos) y celular (polimorfonucleares, macrófagos, linfocitos, y sus respectivas citocinas) también contribuyen a la aparición de este tipo de neumonía (15).

En el caso de la NAVM, el tubo endotraqueal favorece la abolición de las barreras mecánicas del tracto respiratorio superior (glotis, tos y lavado mucociliar), mantiene abierta la glotis facilitando el paso directo de las secreciones orofaríngeas hacia tracto respiratorio inferior y el biofilm que recubre el tubo endotraqueal actúa como reservorio bacteriano (15). La principal vía de infección en estos casos es la aspiración de microbiota endógena a partir de la superficie externa del tubo endotraqueal. Otra vía es la exógena, por inhalación a partir de reservorios exógenos (respiradores, aerosoles, humidificadores) o por aspiración tras manipulaciones. Otras vías menos frecuentes y en pacientes más graves sería la translocación bacteriana de la microbiota intestinal o la colonización pulmonar tras una bacteriemia (15).

1.4 Presentación clínica de la neumonía

Entre los signos y síntomas respiratorios más frecuentes se incluye la tos (con o sin producción de esputo), la disnea y el dolor torácico (21,23). La neumonía bacteriana se asocia con esputo purulento, raramente con sangre. Por su parte, la neumonía vírica se asocia con la producción de esputo acuoso u ocasionalmente mucopurulento. Puede haber dolor torácico pleurítico si la pleura se ve comprometida. En el examen físico se detecta taquipnea, alteraciones en la auscultación y matidez a la percusión o alteración del frémito vocal. En la radiografía de tórax, se observan opacidades en los pulmones por la acumulación de leucocitos y líquido en los alveolos.

A nivel sistémico, la mayoría de pacientes con neumonía presentan fiebre con o sin escalofríos, malestar general, fatiga, pérdida de apetito y mialgias. En algunas ocasiones, los pacientes pueden presentar un estado mental alterado, dolor abdominal, u otros hallazgos sistémicos menos frecuentes. Estos pacientes suelen presentar leucocitosis o leucopenia y alteración de otros marcadores de inflamación. Puesto que la neumonía, junto con la infección urinaria, es la principal causa de sepsis adquirida en la comunidad, la presentación de la infección puede debutar con hipotensión, alteración del estado mental, y otros signos de disfunción orgánica, como insuficiencia renal, insuficiencia hepática y/o trombocitopenia.

Aunque muchos pacientes presentan estos síntomas típicos, existen pacientes con sintomatología más atípica (24). En particular, en los ancianos, la fiebre puede estar ausente y la neumonía puede presentarse con episodios de movilidad reducida, delirio, empeoramiento de enfermedades subyacentes, trastornos cardíacos agudos o dolor abdominal sin signos respiratorios evidentes. Por otro lado, hay que tener en cuenta que los signos y síntomas más comunes de la neumonía no son específicos de esta infección, sino que son comunes a otras patologías respiratorias.

Clásicamente, las neumonías bacterianas se han clasificado en típicas y atípicas. La neumonía neumocócica, que es considerada una neumonía “clásica”, se presenta típicamente de forma brusca con fiebre y escalofríos, tos productiva y dolor pleurítico, leucocitosis con neutrofilia y condensación lobar en la radiografía de tórax (12).

Por otro lado, se habla de neumonía atípica cuando la NAC se presenta con las siguientes características: 1) inicio subagudo o insidioso, menos brusco que en la NAC “clásica”; 2) tos seca o escasamente productiva; 3) ausencia de dolor pleurítico intenso; 4) predominio de manifestaciones extrapulmonares (fiebre, cefalea, artromialgias, etc.); 5) condensación radiológica no lobar; 6) disociación clínico-radiológica (condensación evidente con escasos signos en la auscultación). La neumonía atípica supone un 10-25% de los casos de NAC (12). No debe confundirse la presentación clínica inespecífica, que no orienta hacia ninguna etiología en especial, con el síndrome “atípico”, que sí presenta unas características bien definidas (12).

En el caso de la NAVM, a las 48-72 horas como mínimo de haber comenzado la ventilación mecánica, aparecen infiltrados pulmonares, fiebre o hipotermia, leucocitosis o leucopenia, y secreciones traqueobronquiales purulentas. Sin embargo, no siempre es tan sencillo, ya que muchos de estos pacientes suelen presentar fiebre e infiltrados pulmonares debidos a otros procesos diferentes a las infecciones pulmonares, o, por el contrario, pueden no detectarse por limitaciones técnicas y/o tratamientos concomitantes (12,15).

1.5 Factores de riesgo de la neumonía

1.5.1 Factores de riesgo de la NAC

Entre los factores de riesgo de NAC podemos destacar la edad avanzada, presencia de enfermedades de base (diabetes, enfermedad pulmonar obstructiva crónica [EPOC], bronquiectasias), inmunodepresión (infección por el virus de la inmunodeficiencia humana [VIH], trasplantados) (15), consumo de alcohol (25) y tabaco (26), malnutrición (27), contaminación del aire (10,28,29) o uremia (30).

En los países de baja renta, donde la mayor mortalidad por neumonía se da en niños menores de 5 años, los principales factores de riesgo son la desnutrición, prematuridad y bajo peso al nacer, contaminación del aire en el hogar, falta de cobertura vacunal, y hacinamiento (10).

1.5.2 Factores de riesgo de la NIH

Entre los factores de riesgo de NIH se encuentran la periodontitis, inmunosupresión, enfermedades subyacentes, enfermedad cardiopulmonar, diabetes, EPOC, cirugía previa, tratamiento antibiótico previo, pérdida de consciencia, sedación y empleo de agentes que conlleven una disminución de la eficacia de la tos, como sedantes, analgésicos y anticolinérgicos (15).

1.5.3 Factores de riesgo de la NAVM

Entre los factores de riesgo para adquirir NAVM, además de todas las situaciones que disminuyan las defensas del tracto respiratorio y favorezcan la aspiración de secreciones, destaca la duración prolongada de la ventilación, edad, enfermedad pulmonar crónica, situación de gravedad, traumatismo craneal, profilaxis con antiácidos o anti-H2, sondaje nasogástrico y reintubación (12,15).

1.6 Microbiota pulmonar

Las técnicas de secuenciación masiva han permitido una visión mucho más amplia y detallada de la microbiota pulmonar, ya que el cultivo no nos permite identificar microorganismos de difícil crecimiento y las técnicas moleculares no basadas en la secuenciación tienen un número limitado de dianas. Esto ha permitido que, en los últimos años, haya surgido una nueva forma de entender la neumonía. Tradicionalmente, se clasificaban los microorganismos de vías respiratorias bajas en comensales y patógenos. Cuando se identificaba un microorganismo comensal en una muestra de vías bajas, se clasificaba como contaminante. Desde un punto de vista más complejo, la aspiración desde vías altas a bajas, arrastra microorganismos que pueden ser eliminados por el sistema inmune del huésped o pueden persistir provocando una disbiosis en las vías respiratorias bajas. Esta disbiosis puede aumentar la susceptibilidad del huésped a desarrollar una neumonía (31). No es de extrañar que la composición de la microbiota del tracto respiratorio superior tenga efectos directos en el riesgo de un individuo a desarrollar neumonía, teniendo en cuenta que es el principal reservorio de microorganismos para el tracto

respiratorio inferior. Un estudio en población anciana observó que la reducción en la diversidad y el predominio de los géneros *Rothia*, *Lactobacillus* y *Streptococcus* en la microbiota nasal aumentó el riesgo de neumonía (32).

Es bien sabido que el riesgo de desarrollar NIH aumenta con el uso reciente de antibióticos. Este mayor riesgo puede explicarse en parte a la presión antibiótica que acaba seleccionando determinados microorganismos, lo que lleva a una disbiosis de las vías respiratorias superiores e inferiores, aumentando la posibilidad de que sobrecrezca algún patógeno. Esta presión antibiótica puede afectar a los microorganismos sanos en las vías respiratorias superiores e inferiores, interrumpir la vigilancia inmunológica y fomentar el desarrollo de un microambiente de las vías respiratorias inferiores que respalde a los agentes patógenos (32).

Puesto que la mayor parte de estudios se han centrado en las bacterias, no hay mucha información sobre el papel que juegan virus y hongos en la susceptibilidad a la neumonía.

Un estudio en pacientes de UCI ventilados encontró asociaciones entre la composición bacteriana de la microbiota respiratoria de estos pacientes y el desarrollo o no de neumonía (33), así como con la evolución de los pacientes.

Este tipo de estudios también han ayudado a entender mejor las sobreinfecciones bacterianas tras una infección vírica. Tradicionalmente, la sobreinfección bacteriana se ha achacado al daño de las mucosas y epitelio por los virus, lo que aumentaba la colonización bacteriana de las vías respiratorias. Ahora se ha visto que otro posible mecanismo que podría ayudar a explicar estas sobreinfecciones es la disbiosis producida por la infección viral en las vías respiratorias altas, disbiosis que favorecería la llegada al tracto respiratorio inferior de gran cantidad de bacterias (34). Esto podría ser consecuencia de las señales inmunes sistémicas, así como de los cambios fisiológicos del individuo durante la infección vírica, como puede ser la pérdida de peso, además de otros factores que se desconocen por el momento. En esta línea, se ha descrito una relación bidireccional entre el tracto respiratorio y el intestino: las infecciones respiratorias alteran la microbiota intestinal y, por

otro lado, la microbiota intestinal modula la respuesta inmune frente a los patógenos respiratorios.

Se ha llegado incluso a plantear que la alteración de la microbiota oral podría ser un marcador diagnóstico de neumonía (35). El estudio del microbioma respiratorio podría ayudar también a predecir qué pacientes desarrollarán NAVM (36). Un estudio reciente (37) ha revelado que la microbiota pulmonar está asociada con la evolución del paciente: un aumento de la carga bacteriana y enriquecimiento de la microbiota pulmonar en microorganismos típicos de la microbiota intestinal predicen peor evolución en pacientes críticos con ventilación mecánica.

Se requieren más estudios para entender mejor el papel de la microbiota pulmonar en la neumonía y así poder esclarecer las interacciones microbiota-huésped y microorganismo-microorganismo, lo que probablemente mejorará la prevención, diagnóstico y tratamiento de la neumonía (32). Entre las posibles opciones terapéuticas futuras para la prevención o el tratamiento de la neumonía, podría incluirse el uso de probióticos, prebióticos, o antibióticos selectivos (por ejemplo, erradicación de cepas específicas de bacterias no necesariamente identificadas como patógenas, pero que pueden favorecer el desarrollo de neumonía) (38). Otras terapias que intentan modificar la composición de la microbiota de la vía aérea puede incluir el uso de vacunas conjugadas antibacterianas o bacteriófagos focalizados que eliminan las cepas individuales de una sola especie, así como el reemplazo de toda la comunidad con una nueva microbiota intacta de la vía aérea (39,40), similar al trasplante fecal en la colitis pseudomembranosa por *Clostridioides difficile*.

1.7 Etiología de la neumonía

A pesar de que la identificación del agente etiológico de la neumonía es esencial para un tratamiento eficaz y el mantenimiento de un registro epidemiológico crucial para un tratamiento empírico adecuado, esto no siempre resulta sencillo en la práctica clínica. A menudo no se identifica una sola causa de neumonía y en otros casos la causa de la neumonía queda sin filiar (41,42). En la **Tabla 1** se muestra un resumen de los principales microorganismos causantes de neumonía (21). A continuación, se recoge una descripción más detallada.

1.7.1 Etiología de la NAC

Los patógenos causales en la NAC son típicamente comensales del tracto respiratorio superior e incluyen microorganismos Gram-positivos (con mayor frecuencia *S. pneumoniae*, y también *Staphylococcus aureus*), Gram-negativos (con mayor frecuencia *H. influenzae*, y con menos frecuencia *Moraxella catarrhalis* y *Enterobacteriales* o *Pseudomonas aeruginosa*) y patógenos atípicos (incluyendo *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, y otros) (12,14,43,44). Los virus son cada vez más frecuentes en la NAC (45). Sin embargo, los hongos no son agentes causales típicos de neumonía en adultos inmunocompetentes. Se ha de tener en cuenta que aproximadamente un 10% de las NAC pueden ser mixtas y que casi en el 40% de los casos se desconoce el agente causal (15).

A pesar de que la aparición de la vacuna conjugada ha disminuido el número de neumonías neumocócicas (46), *S. pneumoniae* sigue siendo el agente causal más frecuente de NAC, mientras que la frecuencia relativa de los demás agentes causales es variable dependiendo del área geográfica, la población estudiada y la metodología diagnóstica empleada (12). La prevalencia de la neumonía neumocócica es del 20-65% y responsable de hasta un 35% de las NAC que requieren ingreso hospitalario (15). Gran parte de la población es portadora de *S. pneumoniae* en la orofaringe. Este microorganismo se transmite de persona a persona y la infección se adquiere por aspiración desde la orofaringe. En el 50% de los casos, se presenta como una neumonía “clásica”. La infección por *H. influenzae* se

produce sobre todo en pacientes adultos y ancianos con EPOC, provocando NAC graves y suponiendo un 3-10% de las NAC (15).

Tabla 1. Principales microorganismos causantes de neumonía en pacientes inmunocompetentes. Adaptado de Vila *et al.* (47).

	Neumonía adquirida en la comunidad	Neumonía intrahospitalaria, incluida la asociada a ventilación mecánica
Bacterias	<p><u>Bacterias Gram-positivas:</u></p> <p><i>S. pneumoniae, S. aureus</i></p> <p><u>Bacterias Gram-negativas:</u></p> <p><i>H. influenzae, M. catarrhalis, P. aeruginosa, Klebsiella pneumoniae</i> y otras enterobacterias</p> <p><u>Bacterias atípicas:</u></p> <p><i>M. pneumoniae, L. pneumophila, Chlamydophila pneumoniae, Coxiella burnetii</i></p>	<p><u>Bacterias Gram-positivas:</u></p> <p><i>S. aureus, S. pneumoniae</i></p> <p><u>Bacterias Gram-negativas:</u></p> <p><i>P. aeruginosa, K. pneumoniae, Escherichia coli, Enterobacter spp., Stenotrophomonas maltophilia, Acinetobacter baumannii, y otras enterobacterias, H. influenzae</i></p> <p><u>Anaerobios</u></p>
Virus	Virus de la gripe, rinovirus, coronavirus, virus respiratorio sincitial (VRS), adenovirus, metapneumovirus, virus parainfluenza	VRS, virus de la gripe, virus parainfluenza, rinovirus, citomegalovirus (CMV), virus herpes simple (VHS), coronavirus, rinovirus, metapneumovirus

Los agentes causantes de la neumonía atípica son *M. pneumoniae, C. pneumoniae, L. pneumophila* y las zoonosis producidas por *Chlamydia psittaci* y *C. burnetii* (12,48). En general, son cuadros menos graves, a excepción de *L. pneumophila*, que los de la neumonía “clásica”. *L. pneumophila* tiene como reservorio el agua de los grifos, duchas, aire acondicionado y suelo. Se transmite por inhalación de aerosoles y puede presentarse como una clínica similar a la neumonía neumocócica o como neumonía atípica. *M. pneumoniae* es el segundo agente causante de NAC, produciendo en torno al 20% de las NAC, dato que varía según las áreas geográficas. El cuadro clínico es el de una neumonía atípica (15).

Los virus causan un número importante de NAC, siendo los más frecuentes el virus influenza o virus de la gripe (A y B), rinovirus, coronavirus, seguidos por parainfluenza, metapneumovirus humano, VRS y adenovirus (49).

Un caso especial de NAC es la aspirativa, que supone un 10-15% de los casos de NAC y se produce en pacientes con factores de riesgo de aspiración (higiene oral deficiente, alteración de la consciencia o de la deglución). Este tipo de NAC suele ser polimicrobiana, con microorganismos de la microbiota oral y vías respiratorias superiores, especialmente anaerobios y estreptococos (12).

Entre los pacientes con NAC, hay pacientes con pocas comorbilidades que tienen un riesgo muy bajo de patógenos con resistencia a los antibióticos y es más probable que tengan infecciones por neumococo o neumonías atípicas. Sin embargo, entre los pacientes ancianos y personas con comorbilidades, los patógenos atípicos son poco frecuentes, mientras que la incidencia de *Enterobacteriales* y *P. aeruginosa* aumenta bruscamente.

En general, *M. pneumoniae* y los virus respiratorios son más prevalentes en las personas jóvenes, mientras que la neumonía aspirativa es más frecuente entre la población anciana. Por su parte, *L. pneumophila* suele afectar a pacientes adultos y *H. influenzae* a adultos y ancianos con EPOC. *C. pneumoniae* puede presentarse tanto en jóvenes como en adultos con enfermedades de base, aunque su frecuencia como agente causal único de la NAC no se conoce todavía con exactitud, dependiendo de los criterios clínicos y serológicos utilizados en las distintas series. Tanto *C. psittaci* como *C. burnetii* son causas poco frecuentes de NAC (12).

1.7.2 Etiología de la NIH y NAVM

Los microorganismos responsables de la NIH y la NAVM difieren según el área geográfica, las características de los pacientes, la duración de la estancia hospitalaria y en UCI, así como la presencia de factores de riesgo para patógenos mutirresistentes (50). En general, y en contraste con la NAC, los patógenos causales de la NIH más frecuentes son *S.*

Introducción

aureus, *P. aeruginosa* y las *Enterobacterales*, siendo raros los patógenos atípicos (51). Las diferencias entre NIH y NAVM en cuanto a etiología son mínimas.

Se puede clasificar la NIH en dos grupos:

- Temprana, cuando aparece en los primeros días (4-7 días) tras el ingreso o el inicio de la ventilación mecánica. Está causada por bacterias de la comunidad que colonizan habitualmente la orofaringe (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. aureus* sensible a la meticilina, y otros bacilos Gram-negativos, en general, sensibles a los antibióticos) (15).
- Tardía, cuando se desarrolla más tarde. En este caso están implicados microorganismos hospitalarios que colonizan la orofaringe durante el ingreso.

El papel de los bacilos Gram-negativos (*P. aeruginosa*; *Enterobacterales* como *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. marcescens* y *Enterobacter spp*; *A. baumannii*; y *S. maltophilia*) en la NIH es muy frecuente (20-60%) (15). En la NAVM, *S. aureus* se situaría en segundo lugar (10-30%) (50). Por el contrario, otros microorganismos más prevalentes en la comunidad, como *S. pneumoniae*, *H. influenzae* o *M. pneumoniae* serían menos frecuentes, e incidirían principalmente en las neumonías nosocomiales de aparición precoz. Respecto a la etiología vírica en la NIH, los virus más frecuentes son el VRS, virus de la gripe y virus parainfluenza. En el caso de la NAVM, los más importantes son VHS y CMV (18,52). En un 25% de los casos de NAVM, la etiología es polimicrobiana (12). En el último informe ENVIN (Encuesta Nacional de Vigilancia de Infección Nosocomial) (18), los microorganismos más frecuentes causantes de NAVM fueron *P. aeruginosa* (22%), *S. aureus* (12%), *K. pneumoniae* (9%), *S. maltophilia* (7%), *E. cloacae* (6%), *E. coli* (5%), *S. marcescens* (5%) y *H. influenzae* (5%). El CMV supuso un 1% de los casos.

1.7.3 Resistencia antibiótica

La resistencia a los antibióticos es un problema a nivel mundial (53,54), debido fundamentalmente a un mal uso o abuso de los mismos, así como a su uso extensivo no sólo en humanos sino también en veterinaria, agricultura e industria alimentaria (55). En Estados Unidos, se producen más de 2,8 millones de infecciones por microorganismos resistentes a los antibióticos y más de 35 000 personas mueren como consecuencia, con un gasto asociado de más de 20 000 millones de dólares americanos (56). En Europa, son más de 670 000 las infecciones por bacterias resistentes a los antibióticos, lo que supone unas 33 000 muertes y un coste asociado de 1 000 millones de euros (57). Si la dinámica no cambia, se estima que para 2050, la resistencia a los antibióticos cause 10 millones de muertes al año a nivel mundial (58). En una encuesta global, se observó que la neumonía era la enfermedad para la que más tratamiento antibiótico se utilizaba, suponiendo un 19% de los pacientes tratados (59). Las técnicas moleculares han permitido orientar el tratamiento inicial de forma mucho más efectiva y también un desescalado más rápido (60).

Se habla de microorganismos multirresistente (MDR, del inglés “multidrug resistant”) cuando son resistentes a al menos un antibiótico de tres o más familias, extremadamente resistente (XDR, del inglés “extended-drug resistant”) cuando son resistentes a al menos un antibiótico de todas excepto dos o menos familias, y panresistente (PDR, del inglés “pandrug resistant”) cuando son resistentes a todas las familias de antibióticos (55).

Los factores de riesgo para los patógenos resistentes a múltiples antibióticos están fuertemente relacionados con la edad; comorbilidades, tales como enfermedades respiratorias, demencia e insuficiencia renal; y con el uso previo de antibióticos (61–63). En el caso concreto de *P. aeruginosa*, las enfermedades estructurales del pulmón (bronquiectasias, EPOC) juegan un papel muy importante (55).

En el caso de la NIH y la NAVM, los factores que se asocian con un mayor riesgo de adquisición de microorganismos multirresistentes son, además de la toma previa de antibióticos, el shock séptico, el síndrome respiratorio agudo severo (SARS), la colonización previa por microorganismos MDR, una prevalencia $\geq 25\%$ de MDR en la unidad, cinco o más días de hospitalización previa o el fallo renal agudo con terapia de reemplazo (19,64,65).

1.7.3.1 Resistencia a los antibióticos β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos se caracterizan por presentar un anillo β -lactámico en su estructura e incluyen penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos (66). Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis del peptidoglicano mediante la inhibición de la transpeptidación al unirse a las proteínas de unión a penicilinas (PBPs, del inglés “penicillin-binding proteins”) que son los enzimas que catalizan este proceso de transpeptidación. En las últimas décadas, el grupo de antibióticos de los β -lactámicos se ha usado ampliamente, lo que ha resultado en la aparición de múltiples mecanismos de resistencia. Gran parte de la resistencia a este grupo de antibióticos se debe a enzimas que inactivan estas moléculas, las β -lactamasas (67). Se trata de una gran familia de hidrolasas que catalizan la hidrólisis del enlace amida presente en el anillo β -lactámico de los antibióticos β -lactámicos. Este problema es especialmente grave entre los bacilos Gram-negativos y, sobre todo, cuando los genes responsables de la resistencia se encuentran en elementos móviles, ya que pueden transferirse entre especies.

Las principales familias de β -lactamasas incluyen las β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs), cefalosporinasas de tipo AmpC, y carbapenemasas. La nomenclatura de las β -lactamasas se basa en su estructura y su función. Las clases estructurales fueron primero definidas por Ambler en 1980 (68). Desde entonces, se han ido incorporando nuevas clases y subclases estructurales, así como actualizando mediante la combinación de características estructurales y funcionales (69). A continuación, se muestra una de las clasificaciones más recientes (**Tabla 2**).

Dentro del grupo de las BLEEs, las más prevalente son las del tipo CTX-M, tanto a nivel nosocomial como comunitario (70). Esta familia comprende numerosas enzimas clasificadas en distintos grupos: grupo CTX-M-1, grupo CTX-M-2, grupo CTX-M-8, grupo CTX-M-9, y grupo CTX-M-25 (66). Entre todas ellas, la CTX-M-15, perteneciente al grupo CTX-M-1, es la que se asocia con mayor frecuencia a aislamientos clínicamente relevantes de *E. coli* y otros *Enterobacterales* en todo el mundo (**Figura 2**; **Figura 3**). Confiere resistencia a penicilinas y cefalosporinas, incluida la ceftazidima (66).

Tabla 2. Principales β -lactamasas clínicamente relevantes. Se indica su clasificación estructural y funcional, nombre común, principales representantes, antibióticos que inactivan, así como moléculas que inhiben su actividad. Se basa en la clasificación de Bush y Jacoby (69).

Clase o subclase molecular	Grupo o subgrupo funcional	Nombre común	Enzima(s) o familia(s) de enzimas clínicamente relevantes	Diana	Inhibidores
A	2a	Penicilinas	PC1/ <i>blaZ</i>	Penicilinas de espectro reducido	Ácido clavulánico, tazobactam
A	2b	Penicilinas	TEM-1, SHAV-1	Penicilinas de espectro reducido, primeras cefalosporinas	Ácido clavulánico, tazobactam
A	2be	BLEE	TEM-10, SHV-2, CTX-M-15	Penicilinas de espectro reducido, primeras cefalosporinas, cefalosporinas de espectro extendido	Ácido clavulánico, tazobactam, avibactam
A	2f	Carbapenemasa	KPC	β -lactámicos	Avibactam
B1, B3	3a	Metalo- β -lactamasa, carbapenemasa	IMP, NDM, VIM	Penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos	EDTA, Aztreonam
C	1	Cefalosporinasa	AmpC	Cefalosporinas	Aztreonam, avibactam
D	2df	Carbapenemasa	OXA-23, OXA-48, OXA-181	Penicilinas, carbapenémicos	Avibactam (OXA-48)

Introducción

Figura 2. Evolución en el tiempo del porcentaje de resistencia a cefalosporinas de tercera generación en aislamientos de *E. coli* entre 2002 (A), 2010 (B) y 2018 (C) en los países que participan en el sistema de vigilancia europeo. Figura adaptada de: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Dataset=27&HealthTopic=4>

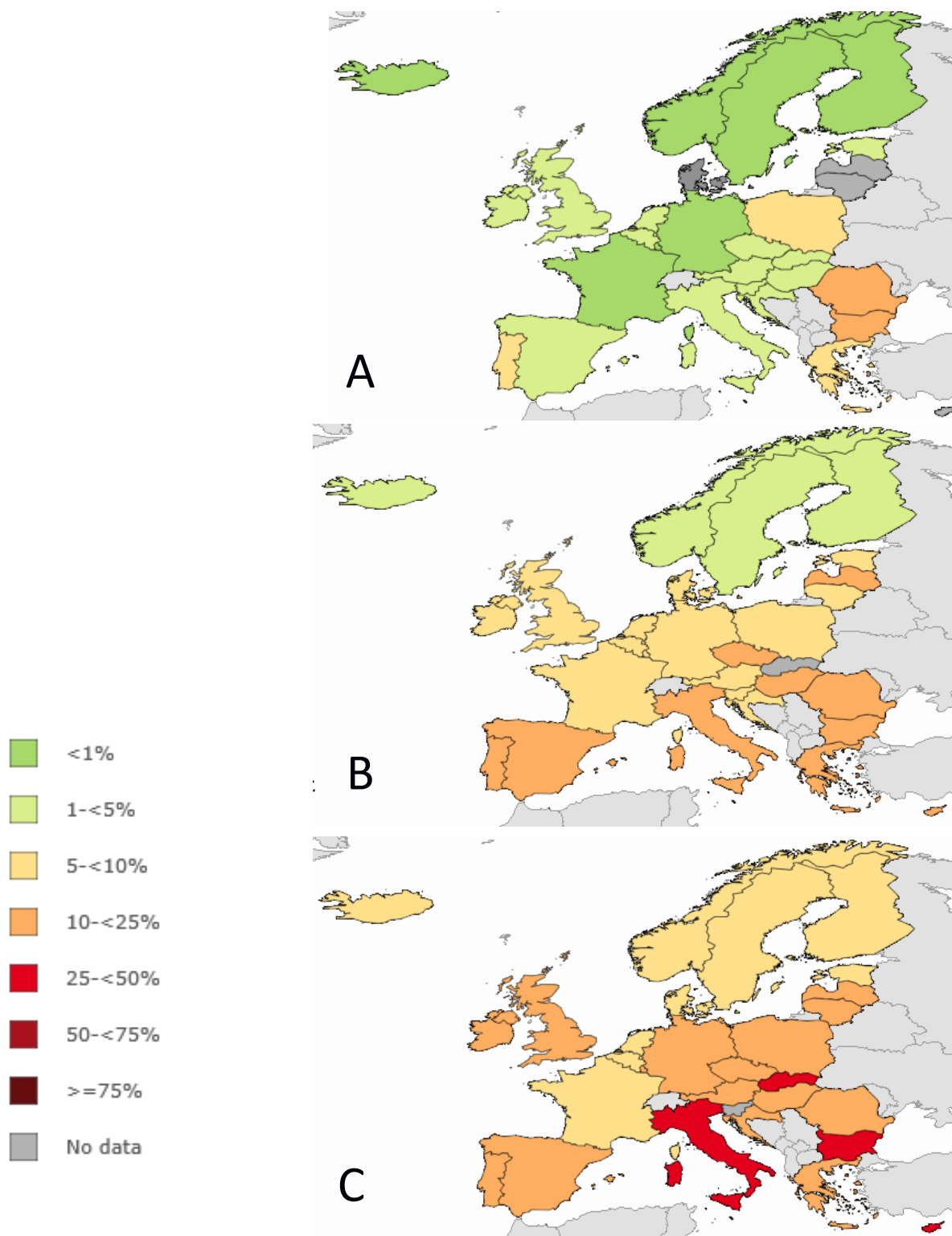
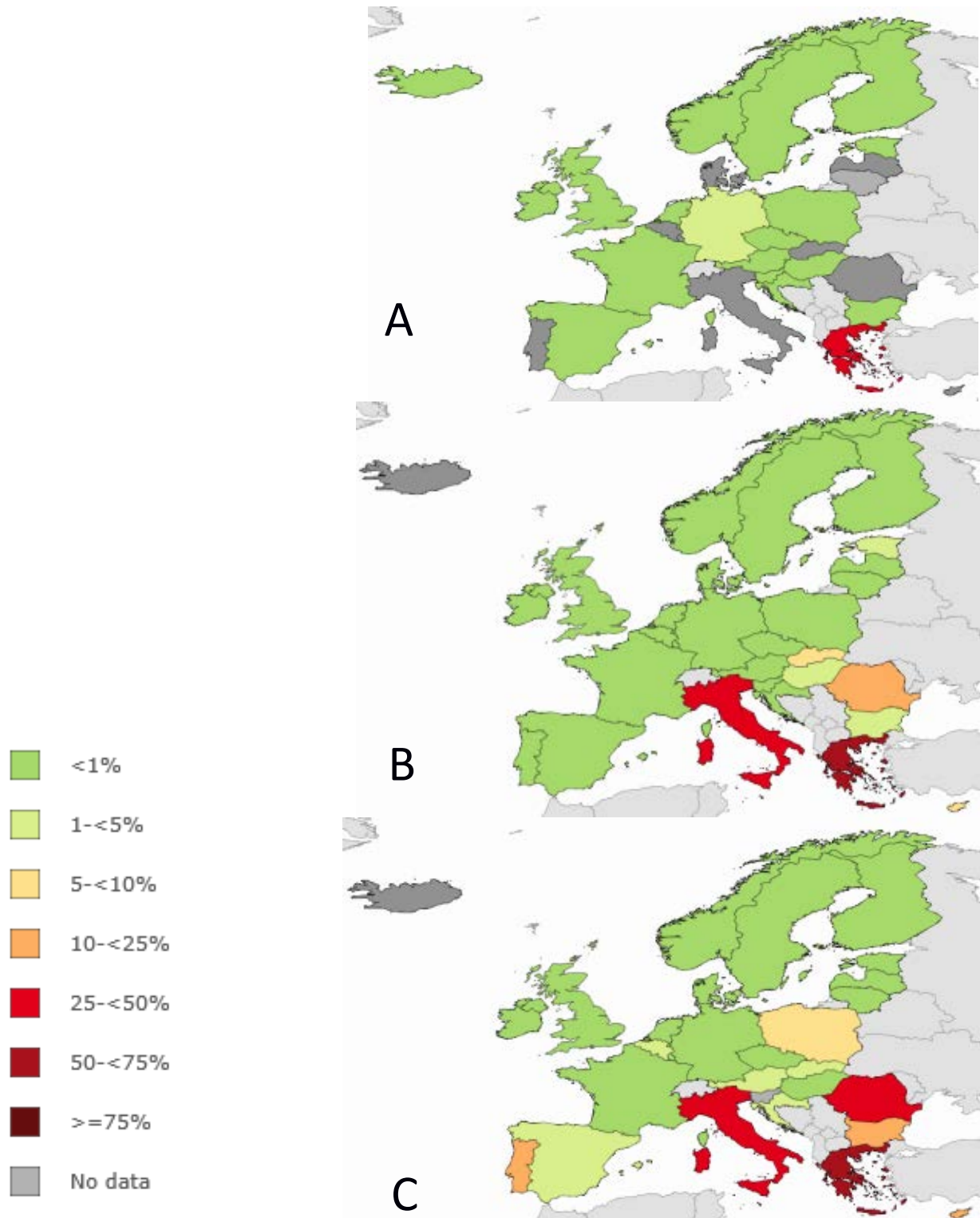


Figura 3. Evolución en el tiempo del porcentaje de resistencia a cefalosporinas de tercera generación en aislamientos de *K. pneumoniae* entre 2005 (A), 2012 (B) y 2018 (C) en los países que participan en el sistema de vigilancia europeo. Figura adaptada de: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Dataset=27&HealthTopic=4>



El mal uso y abuso de este grupo de antibióticos ha favorecido la aparición de resistencias a los β -lactámicos de última línea, los carbapenémicos. Aunque se conocen como carbapenemasas, la mayoría de estas enzimas reconocen e hidrolizan casi todos los β -lactámicos y son resistentes a la acción de los inhibidores de las β -lactamasas (66).

Dentro de las carbapenemasas de clase A, la que más interés clínico tiene es la KPC. Todas tienen la capacidad de hidrolizar una amplia variedad de β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, aztreonam y carbapenémicos) y todas son inhibidas por el ácido clavulánico y el tazobactam. Entre las metalo- β -lactamasas, las más comunes son las familias VIM, IMP y NDM. En este caso, hidrolizan todos los β -lactámicos, excepto el aztreonam. No son inhibidas por el ácido clavulánico ni el tazobactam, pero sí por agentes quelantes como el EDTA. Respecto a las carbapenemasas de clase D (grupo 2df de Bush-Jacoby), se pueden dividir en varios grupos. La inmensa mayoría de las OXA que presentan actividad carbapenemasa se encuentran en especies de *Acinetobacter* spp, aunque su presencia entre los *Enterobacterales* es cada vez mayor. El nivel de actividad hidrolítica de estas enzimas es bastante débil comparado con la de otros grupos. La que presenta mayor actividad carbapenemasa entre las enzimas de tipo OXA es la OXA-48, aislada en *Enterobacterales*, sobre todo *K. pneumoniae* y *E. coli*.

Aunque los patrones de resistencia pueden ser geográficamente distintos, cualquier nuevo mecanismo de resistencia puede extenderse rápidamente a otras áreas. Por ello, es fundamental contar con herramientas para su rápida detección.

1.7.3.2 Resistencia antibiótica en la NAC

Las primeras cepas de *S. pneumoniae* resistentes a penicilina aparecieron en los años 70 en Estados Unidos (71). La prevalencia hoy en día depende de los países. El mecanismo por el que desarrolla resistencia a la penicilina es por mutaciones en los genes que codifica la PBP. Por suerte, la resistencia a cefalosporinas se mantiene en niveles bajos. Por otro lado, la resistencia a macrólidos puede deberse a dos mecanismos: metilación ribosómica, asociada a mayor nivel de resistencia y más frecuente en España (72); o expresión de bombas de

eflujo, asociado a menor nivel de resistencia. Los niveles de resistencia a macrólidos en *S. pneumoniae* están en aumento (73,74), lo que puede suponer un problema en los próximos años. La resistencia a las fluoroquinolonas se mantiene baja (75).

Desde el año 2000, se han detectado casos de cepas de *M. pneumoniae* resistentes a macrólidos (76), aunque en Europa la prevalencia todavía es baja (74). El mecanismo de resistencia subyacente consiste en mutaciones en el gen 23S del ARN ribosomal. Por su parte, *L. pneumophila* se mantiene sensible al tratamiento de elección con macrólidos y fluoroquinolonas (75). Lo mismo ocurre con *C. pneumoniae*, que se trata normalmente con claritromicina, tetraciclina, fluoroquinolonas o rifampicina (77). Sin embargo, debido a la dificultad para su cultivo, la prevalencia de resistencia a antibióticos de esta bacteria podría estar infraestimada.

La prevalencia de cepas de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) ha aumentado en los últimos años (75). En Europa, la prevalencia de NAC por SARM se sitúa en torno al 6% (78). En un estudio prospectivo realizado en el Hospital Clínic de Barcelona durante un periodo de 16 años y publicado en el año 2014, un 1.3% de las NAC estuvo causado por SARM (62). Esta resistencia se debe a la adquisición del gen *mecA* que codifica una PBP modificada de baja afinidad, la PBP2a. Por otro lado, el alto porcentaje de resistencia de *S. aureus* a clindamicina, hace que este antibiótico deba usarse en combinación.

Respecto a las bacterias Gram-negativas, *H. influenzae* no presenta grandes problemas de resistencia por ahora, no así los *Enterobacterales*. Aunque el principal microorganismo causante de las NAC es *S. pneumoniae* y las bacterias Gram-negativas suponen un porcentaje bajo de los casos, el principal problema de éstas es la resistencia antibiótica. En las últimas décadas, se ha registrado un aumento global de la resistencia antibiótica en *K. pneumoniae*. Los principales mecanismos de resistencia adquiridos son la expresión de BLEEs, que confieren resistencia a penicilinas, cefalosporinas y monobactamas, así como la expresión de carbapenemasas, que confieren resistencia a todos los β -lactámicos, incluidos carbapenémicos. Aproximadamente, el 1-7% de los casos de NAC están causados por *K. pneumoniae*, siendo un 5-36% de los casos cepas MDR (79,80). En el caso de *P. aeruginosa*, la prevalencia de NAC por esta bacteria en Europa es baja (no llega al 4%), así

como la prevalencia de *P. aeruginosa* con resistencia antibiótica (1.6%) y de *P. aeruginosa* MDR (0,9%) (81). En España, la prevalencia de *P. aeruginosa* MDR en NAC es similar a la situación europea (82).

En comparación con la NIH, el impacto de la resistencia a los antibióticos en la NAC es relativamente pequeño (75). La resistencia se limita generalmente a escenarios clínicos bastante bien circunscritos, normalmente asociados a la exposición al ambiente hospitalario. En un estudio realizado en el Hospital Clínic de Barcelona en el que se incluyeron 2 892 pacientes con NAC (83), en un 10% de los casos con NAC y bacteriemia se aisló en los hemocultivos un microorganismo resistente a los antibióticos (SARM, *S. pneumoniae* multi-resistente, *Enterobacterales* productores de BLEE o *P. aeruginosa*). Entre los factores de riesgo para presentar NAC por microorganismos multirresistentes se encuentra la colonización/infección previa por microorganismos multirresistentes, uso previo de antibióticos, estancia en residencia de ancianos, hospitalizaciones previas, edad avanzada, inmunosupresión y otras comorbilidades (84,85). ¿Deberían los clínicos seleccionar antibióticos de amplio espectro que cubran los microorganismos multirresistentes si los pacientes con NAC tienen uno de los factores de riesgo? Probablemente, no. No obstante, cuando los pacientes presentan varios de estos factores, el riesgo es alto y entonces sí podrían ser pacientes candidatos a recibir antibióticos de amplio espectro (85).

1.7.3.3 Resistencia antibiótica en la NIH y NAVM

La frecuencia de patógenos MDR que causan NIH puede variar según el hospital, exposición a antibióticos y tipo de paciente de UCI. En el último informe ENVIN (18), la NAVM por SARM se situó en un 1,7%. En cuanto a la bacteria Gram-negativa más frecuente causante de NAVM, se registró un 6% aproximadamente de cepas de *K. pneumoniae* resistente a carbapenems. En el caso de *H. influenzae*, un 5% de cepas fueron resistentes a ampicilina, aunque todas las cepas fueron sensibles a amoxicilina/clavulánico.

P. aeruginosa presenta mecanismos de resistencia intrínseca, adaptativa y adquirida, siendo los más frecuentes la expresión de β -lactamasas y la disminución de la permeabilidad

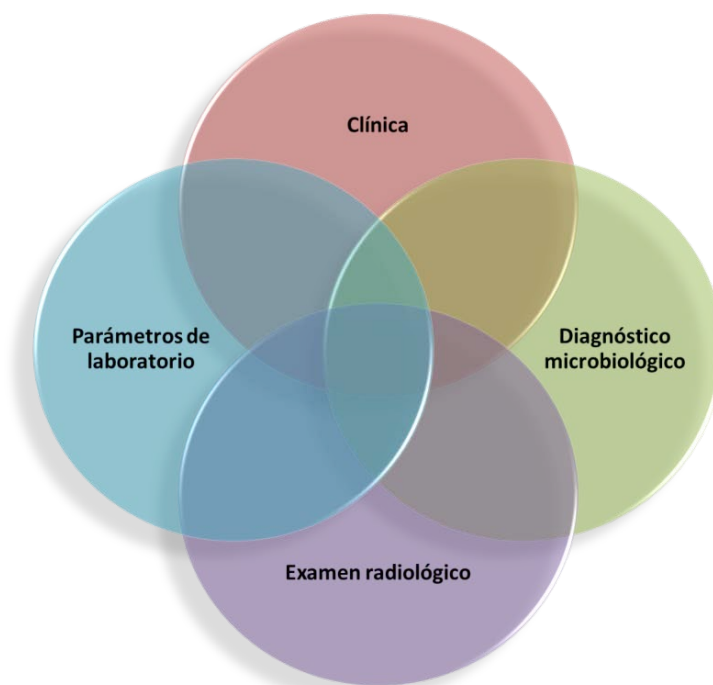
por expresión de bombas de eflujo o alteración de porinas transmembrana. Además, forma biofilm con facilidad, lo que la hace más resistente al tratamiento antibiótico.

S. maltophilia es intrínsecamente resistente a los carbapenémicos y frecuentemente contiene elementos genéticos que le proporcionan resistencia a otros β -lactámicos, fluoroquinolonas, aminoglicósidos y tetraciclinas.

1.8 Diagnóstico de la neumonía

El diagnóstico de la neumonía se sustenta en 4 pilares (**Figura 4**): evaluación clínica, evaluación radiológica, estudio de biomarcadores inflamatorios y diagnóstico microbiológico.

Figura 4. Pilares sobre los que se sustenta el diagnóstico de la neumonía.



1.8.1 Diagnóstico clínico y radiológico de la neumonía

El diagnóstico clínico de la neumonía implica realizar un historial completo y un examen físico para identificar los signos y síntomas descritos en la sección de presentación clínica de la neumonía. La saturación de oxígeno, el hemograma y la bioquímica elemental incluyendo el examen de la función renal, función hepática y electrolitos informan sobre el estado del paciente. Según las guías de la IDSA y la ATS, se requiere la observación de un infiltrado en la radiografía de tórax y éste se considera el mejor método (junto con hallazgos clínicos que lo apoyen) para el diagnóstico de neumonía. Los hallazgos pueden variar de lobar a infiltrado intersticial, a lesiones cavitarias con presencia de líquido en el aire que sugieren procesos más graves (21). Muchos consideran la radiografía de tórax como el estándar de referencia para el diagnóstico de neumonía, aunque no es 100% sensible y puede haber neumonía sin hallazgos en la radiografía de tórax (24).

Es necesario realizar un diagnóstico diferencial con las patologías más frecuentes (86): bronquitis aguda, exacerbación de EPOC, exacerbación de asma, exacerbación de bronquiectasia, fallo cardíaco y edema pulmonar, cáncer de pulmón, sepsis de foco no respiratorio, embolismo pulmonar o tuberculosis.

Además del diagnóstico clínico, se utilizan distintos índices validados para evaluar la gravedad inicial del paciente con NAC, como es el PSI (del inglés “Pneumonia severity index”), CURB-65 (del inglés “Confusion, urea, respiratory rate, blood pressure and age ≥ 65 years”) o CRB-65 (del inglés “Confusion, respiratory rate, blood pressure and age ≥ 65 years”) (87). Esta valoración del pronóstico servirá para decidir si el paciente debe ser hospitalizado o no, así como para decidir si debe iniciarse tratamiento empírico cuanto antes (24). En esta misma línea, el interés por el uso de biomarcadores para predecir la gravedad de los pacientes con neumonía es creciente (24), tal como se desarrollará en un apartado posterior.

1.8.2 Diagnóstico microbiológico de la neumonía

El diagnóstico microbiológico de la neumonía es esencial para asegurar un tratamiento antibiótico óptimo, lo que se asocia con una menor mortalidad (42). Sin embargo, el diagnóstico etiológico se consigue sólo en la mitad de los casos aproximadamente (88), y se debe entonces comenzar tratamiento empírico para evitar retrasar el inicio del tratamiento lo que se asocia con una mayor mortalidad (89,90). El diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto respiratorio inferior presenta importantes limitaciones debido a su baja rentabilidad y a la dificultad de obtener muestras de calidad adecuada. Las técnicas microbiológicas disponibles para diagnosticar la neumonía se pueden clasificar en dos grandes bloques que se describen en los siguientes apartados.

Tradicionalmente, el diagnóstico microbiológico de la neumonía se ha basado en el aislamiento de bacterias y hongos mediante diferentes medios de cultivo, aislamiento de virus mediante cultivo celular, detección de antígeno y detección de anticuerpos (serología) (15). Las técnicas moleculares supusieron un gran avance en el diagnóstico rápido de las neumonías, especialmente en las de etiología vírica (91).

Sin embargo, se requiere investigación e inversión en el área del diagnóstico microbiológico centradas en la búsqueda de pruebas de diagnóstico rápidas, rentables, sensibles y específicas para identificar los microorganismos causantes de la neumonía que contribuyan al manejo del paciente favoreciendo una terapia más dirigida, especialmente cuando haya factores de riesgo para patógenos resistentes a antibióticos. Todas las nuevas pruebas de diagnóstico deberían ser evaluadas teniendo en cuenta el impacto sobre las decisiones en la elección de tratamiento y la evolución del paciente (4). Un tratamiento inicial inadecuado se asocia a mayor mortalidad, mientras que un exceso de tratamiento antibiótico conlleva complicaciones, mayor coste y aumento de resistencias antibióticas (15).

1.8.2.1 Técnicas convencionales

Cultivo.

El diagnóstico de referencia incluye la tinción de Gram y el cultivo cuantitativo, seguido de la identificación de los microorganismos por espectrometría de masas MALDI-TOF (del inglés “Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry”) y el estudio de la sensibilidad antibiótica mediante la realización del antibiograma. Además de la dificultad de diferenciar entre colonización e infección, este proceso requiere aproximadamente dos días en el caso de las bacterias y hasta varias semanas en el caso de virus y hongos, y tiene una baja sensibilidad, sobre todo en aquellos pacientes que ya han iniciado la toma de antibióticos antes de que la muestra sea recogida.

El esputo es la muestra respiratoria más frecuente, aunque también es la más problemática de cara a interpretar los resultados (microorganismos no cultivables, pérdida de microorganismos por retraso en el procesamiento y toma previa de antibióticos, así como contaminación con microbiota orofaríngea). Por ello, se debe valorar microscópicamente la calidad de la muestra recibida (un esputo de buena calidad presentará a 100x menos de 10 células epiteliales por campo y más de 25 leucocitos por campo). Se recomienda su recogida en la última guía ATS/IDSA en pacientes con NAC severa, así como en todos los pacientes hospitalizados tratados empíricamente para SARM o *P. aeruginosa* (4). La baja rentabilidad de los estudios microbiológicos tiene mucho que ver con la calidad con que se tome esa muestra de esputo y con el hecho de que el paciente haya recibido tratamiento antibiótico antes de la obtención de la muestra biológica.

El aspirado traqueal (AT) es el método más sencillo de obtener secreciones respiratorias en los pacientes intubados y con ventilación mecánica para la detección de los agentes causales de la infección del tracto respiratorio inferior. La recogida de la muestra se realiza por aspiración a través del tubo endotraqueal. En ocasiones puede ser necesario diluir con suero salino las secreciones viscosas y facilitar de este modo la recogida y la siembra de las mismas.

La fibrobroncoscopia tiene por objeto la obtención de muestras representativas del tracto respiratorio inferior correspondientes a la vía aérea o al segmento pulmonar radiológicamente afectados, sin contaminación con microbiota de la orofaringe o, al menos, con la menor contaminación posible. Las muestras más empleadas en nuestro entorno son el broncoaspirado (BAS) y el lavado broncoalveolar (LBA). La obtención de muestras representativas del tracto respiratorio inferior se indica en los casos de NIH o NAC grave, así como en los casos de NAVM.

El cultivo cuantitativo tiene como objetivo diferenciar las bacterias colonizadoras de la orofaringe que contaminan la muestra y que están presentes en pequeña cantidad de las bacterias potencialmente patógenas, presentes en altas concentraciones. Se establece un punto de corte para distinguir infección de colonización (10^5 UFC/mL para BAS y AT, y 10^4 UFC/mL para los LBA) (14). En los casos de NAC leves y tratamiento ambulatorio, se suele iniciar tratamiento antibiótico y no se suele recoger muestras para su cultivo (12).

Por su parte, el rendimiento de los hemocultivos en la mayoría de series de adultos con NAC no grave es bajo (del 2% en pacientes ambulatorios al 9% en pacientes hospitalizados) (4,92–94). Se recomienda tomar hemocultivos en pacientes con NAC grave o aquellos con una probabilidad elevada de presentar una infección por patógenos resistentes (pacientes tratados empíricamente para SARM o *P. aeruginosa*, pacientes con infecciones previas por estos microorganismos, o pacientes hospitalizados y con tratamiento antibiótico parenteral en los últimos 90 días). Los hemocultivos son positivos en menos del 20% de los casos (92), ya que en muchos casos no hay bacteriemia, y en pacientes inmunocompetentes su utilidad es limitada (95). Además, el número de hemocultivos contaminados, sobre todo con estafilococos coagulasa negativos de la piel, es frecuente, y además, en muchos casos, los resultados de los hemocultivos no implican un cambio en la terapia antibiótica.

Detección de antígeno.

La detección de antígeno de *S. pneumoniae* y *L. pneumophila* en orina es una técnica que está implementada en prácticamente cualquier laboratorio, dada la rapidez con la que se obtienen los resultados y la facilidad para obtener la muestra a estudio. Respecto a la

Introducción

detección del polisacárido C de *S. pneumoniae* mediante inmunocromatografía, la sensibilidad está alrededor del 80% (96), aunque depende del serotipo (97), y la especificidad entre un 94-97% (98). El primer ensayo apareció en los años 90 y se basaba en una inmunocromatografía (Binax, Alere®). Aunque este ensayo se sigue empleando hoy en día, han aparecido nuevos formatos que permiten la lectura automatizada, así como la detección de serotipos (98). En cuanto a la prueba de antígeno urinario para *L. pneumophila*, tiene una sensibilidad del 75-80% y una especificidad prácticamente del 100% (99). La limitación es que las pruebas existentes identifican solo el serogrupo 1 (100).

En las últimas guías americanas (4), no se recomienda realizar la determinación del antígeno de *L. pneumophila* en orina de forma rutinaria a no ser que exista una justificación epidemiológica (brote) o se trate de una NAC grave. Se recomienda además la recogida de muestra respiratoria de vías bajas para el cultivo en medios selectivos para *L. pneumophila*, así como la realización de técnicas moleculares. En el caso del antígeno de *S. pneumoniae* en orina, se recomienda su realización en el caso de NAC grave.

Serología.

La detección de IgM o seroconversión mediante la medición de títulos de anticuerpos frente a *M. pneumoniae*, *L. pneumophila* y otros atípicos se han recomendado durante mucho tiempo en las guías, pero su sensibilidad es limitada (30-60%) y sólo se puede determinar retrospectivamente. Por tanto, no es útil para guiar el tratamiento. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés “Polymerase chain reaction”) es ahora el método de elección para la detección de todos los patógenos atípicos en la faringe o vías bajas del tracto respiratorio (101–104).

Cultivo celular.

Al igual que ocurre con la serología, el cultivo celular no siempre es de ayuda en el manejo del paciente, debido a la demora en obtener los resultados. Además, requiere

instalaciones especiales y personal bien preparado para su realización. Sin embargo, sí que son muy útiles para poder estudiar la sensibilidad a los antivirales, la viabilidad de las cepas y su caracterización.

1.8.2.2 Técnicas moleculares

Los métodos moleculares, especialmente los basados en PCR, se usan de forma rutinaria en la mayor parte de los laboratorios, fundamentalmente para el diagnóstico de infecciones por microorganismos de difícil o lento crecimiento. Sin embargo, son cada vez más las técnicas moleculares disponibles para la identificación de los patógenos más frecuentes involucrados en la NAC, NIH o NAVM, así como de marcadores de resistencia. Son técnicas de diagnóstico rápidas que nos permiten identificar un patógeno concreto o diferenciar entre una infección bacteriana y viral, proporcionan información sobre resistencia a los antibióticos y nos ayudan a optimizar el tratamiento de forma precoz (105).

En los últimos años, se han desarrollado numerosas técnicas moleculares, tanto caseras (106) como comerciales, que permiten identificar simultáneamente numerosos patógenos respiratorios a la vez. En la [Tabla 3](#), se resumen las características de algunas de ellas. Por otro lado, se han desarrollado diferentes sistemas integrados que incluyen la extracción, amplificación y detección. Algunos ejemplos de sistemas moleculares integrados con aplicación en el diagnóstico de la neumonía serían GeneXpert (Cepheid) para la identificación de *S. aureus* y su perfil de resistencia a meticilina (91) o para la detección de influenza A, B y VRS; Filmarray (bioMérieux), que cuenta con un panel de detección de patógenos causantes de NAC y otro para NIH; o STAT (QIAGEN) con el panel de detección de patógenos de NAC o NIH. En el caso concreto de la gripe, ante un paciente con NAC en temporada de circulación del virus de la gripe, se recomienda una prueba molecular rápida, ya que se recomienda iniciar tratamiento si es positiva, pero además permite el aislamiento de estos pacientes en el hospital (4).

Tabla 3. Comparación de métodos moleculares comerciales para el diagnóstico de infecciones respiratorias. Adaptado y actualizado de (47).

Técnica	Casa comercial	Método	Diana	Tiempo de respuesta aproximado (hh:mm)
eSensor® Respiratory Viral Panel (RVP) (107)	GenMark	Microarray fase sólida / Detección electroquímica	Inf (A, H1, H3, H1 2009, B), VRS (A, B), AdV (B/E, C), MpV, PiV (1, 2, 3), RnV	06:00
VERIGENE® Respiratory y Pathogens Flex Test (RP Flex) (108)	Luminex	Multiplex RT-PCR / Microarray fase sólida con nanopartículas de oro	Inf (A, H1, H3, H1 2009, B), AdV, VRS (A, B), MpV, PiV (1, 2, 3, 4), RnV, BPer, BPar, BHol	02:00
NxTAG Respiratory Pathogen Panel (109)	Luminex	Multiplex RT-PCR / Microarray en suspensión / Detección por citometría de flujo	Inf (A, H1, H3, B), VRS (A, B), AdV, CoV (229E, OC43, NL63, HKU1), MpV, PiV (1, 2, 3, 4), RnV/EV, BoV, MPne, CPne	05:00
CLART® PneumoVir 2 (110)	Genomica	Multiplex RT-PCR / Microarray de baja densidad / Detección CAR®	Inf (A, H1, H3, H1 2009, H7N9, B, C), VRS (A, B), AdV, CoV (229E, OC43, NL63), MpV (A, B), PiV (1, 2, 3, 4a, 4b), RnV, BoV, EV	09:00
Anyplex II RV16 (111)	Seegene	Multiplex PCR tiempo real / TOCE / CMTA	Inf (A, H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H9, H10, H11, B), VRS (A, B), AdV (A-F), CoV (229E, OC43/ HKU1, NL63), MpV, PiV (1, 2, 3, 4), RnV (A-C), EV, BoV (1-4)	06:00-07:00
FilmArray Respiratory 2 plus Panel (112)	bioMérieux	Nested multiplex RT-PCR / Análisis melting	Inf (A, H1, H3, H1 2009, B), VRS, AdV, CoV (229E, OC43, NL63, HKU1, MERS), MpV, PiV (1, 2, 3, 4), RnV/EV, BPer, BPar, MPne, CPne	00:45

Biofire FilmArray Pneumonia Plus Panel (113–115)	bioMérieux	Nested multiplex RT-PCR / Análisis melting	ABau, EClo, ECol, HInf, KAer, KOxy, KPne, MCat, Prot, PAer, SMar, SAur, SAga, SPne, SPyo, CPne, LPne, MPne, Inf (A, B), VRS, AdV, CoV, MERS, MpV, PiV, RnV/EV, mecA, mecC, MERJ, KPC, NDM, OXA48, VIM, IMP, CTXM	01:15
Xpert® Xpress Flu/RSV (116)	Cepheid	RT-PCR tiempo real / Sondas fluorescentes	Inf (A, B), VRS	00:20
Unyvero Hospitalised Pneumonia panel (117–122)	Curetis	Multiplex RT-PCR / Detección de amplicones por hibridación en array	SAur, SPne, CFre, ECol, EClo, KAer, Prot, KPne, KVar, SMar, MMor, MCat, PAer, ABau, SMal, Leg, <i>P. jirovecii</i> ; KOxy, HInf, MPne, CPne, ermB, mecA, mecC, CTXM, <i>gyrA83</i> , <i>gyrA87</i> , IMP, KPC, NDM, OXA23, OXA24, OXA48, OXA58, SUL1, SHV, TEM, VIM	05:00
RespiFinder® 2SMART (123)	PathoFinder	MLPA / Electroforesis microcapilar	Inf (A, H1 2009, B), VRS (A, B), AdV, CoV (229E, OC43, NL63/HKU1), MpV, PiV (1, 2, 3, 4), RnV/EV, EcV, BoV, BPer, MPne, CPne, LPne	04:00
QIAstat-Dx Respiratory SARS-CoV-2 Panel (124)	QIAGEN	RT-PCR tiempo real / Sondas marcadas	Inf (A, H1, H1 2009, H3, B), VRS (A, B), AdV, CoV (229E, OC43, NL63, HKU1), SARS-CoV-2, MpV, PiV (1, 2, 3, 4), RnV/EV, BPer, MPne, CPne, LPne	01:10
Allplex® Respiratory Panel (125)	Seegene	PCR a tiempo real multiplex	Inf (A, H1, H1 2009, H3, B), VRS (A, B), AdV, CoV (229E, OC43, NL63), MpV, PiV (1, 2, 3, 4), RnV, EV, BoV (1-4), BPer, BPar, CPne, HInf, LPne, MPne, SPne	06:00

cobas® Liat® (126)	Roche	PCR a tiempo real	Inf (A, B), VRS	00:20
ePlex Respiratory Pathogen (RP) Panel (127)	GenMark	Electrohumectación / Microarray fase sólida / Detección electroquímica	Inf (A, H1, H3, H1 2009, B), VRS (A, B), AdV, PiV (1, 2, 3, 4), MpV, CoV (229E, OC43, NL63, HKU1), RnV, MPne, CPne	01:30

Abau: *Acinetobacter calcoaceticus baumannii complex*, AdV: Adenovirus; BoV: Bocavirus; BHol: *Bordetella holmensis*; BPar: *Bordetella parapertussis*, BPer: *Bordetella pertussis*; CAR®: clinical array reader; CFre: *Citrobacter freundii*; CMTA: catcher melting-temperature analysis; CMV: Citomegalovirus; CoV: Coronavirus; CPne: *Chlamydophila pneumoniae*; CxV: Coxsackievirus; DPO: dual priming oligonucleotide; EClo: *Enterobacter cloacae complex*; ECol: *Escherichia coli*; EcV: Echovirus; EV: Enterovirus; HInf: *Haemophilus influenzae*; Inf: Influenza; H1: Influenza A H1N1 epidémico; H1 2009: Influenza A H1N1 pandémico; KAer: *Klebsiella aerogenes*; KOxy: *Klebsiella oxytoca*; KPneu, *Klebsiella pneumoniae*; KVar: *Klebsiella variicola*; Leg: *Legionella spp*; MCat: *Moraxella catharralis*; MERS: Middle East respiratory syndrome; MMor: *Morganella morganii*; MPne: *Mycoplasma pneumoniae*; MpV: Metapneumovirus; MLPA: multiplex ligation-dependent probe amplification; PAer: *Pseudomonas aeruginosa*; PcV: Parechovirus; PiV: Parainfluenzavirus; PJir: *Pneumocystis jiroveci*; Prot: *Proteus spp.*, RnV: Rinovirus; RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction; SAga: *Streptococcus agalactiae*; SAur: *Staphylococcus aureus*; SMar: *Serratia marcescens*; SMal: *Stenotrophomonas maltophilia*; SPne: *Streptococcus pneumoniae*; SPyo: *Streptococcus pyogenes*; TOCE: tagging oligonucleotide cleavage extensión; VRS: Virus respiratorio sincitial.

Otras pruebas moleculares se centran en la detección de genes de resistencia (128) e incluso hay ensayos que incluyen un amplio panel de bacterias, virus, así como de genes de resistencias (Tabla 3). La principal limitación de la detección de genes de resistencia mediante métodos moleculares es la discrepancia entre genotipo y fenotipo. Otros obstáculos son la aparición de nuevos mecanismos de resistencia no incluidos en estos paneles que pueden llevar a falsos negativos, así como detección de resistencia genotípica que puede no comportar una resistencia clínicamente significativa. Sin embargo, estas técnicas proporcionan una información muy rápida y valiosa para orientar mejor el tratamiento empírico y no pretenden sustituir al cultivo, sino complementarlo.

Discernir entre una contaminación y una infección sigue siendo una limitación en este tipo de técnicas. Así como en el caso de los cultivos cuantitativos se han establecido unos valores de referencia para diferenciar infección de colonización, en el caso de las técnicas moleculares, también contamos con PCR cuantitativas. Algunos paneles moleculares incluyen además de la identificación una semicuantificación que puede ser útil por ejemplo para monitorizar la respuesta al tratamiento (los valores de Ct -*Cycle threshold*- se pueden utilizar para estimar la carga de microorganismos) (113).

En definitiva, las técnicas moleculares presentan numerosas ventajas que las convierten en indispensables en un laboratorio de Microbiología hoy en día, destacando su rapidez en la obtención de resultados, la detección simultánea de múltiples microorganismos y genes de resistencia, así como los sistemas integrados que disminuyen al mínimo la manipulación de la muestra. Sin embargo, al igual que el resto de técnicas microbiológicas, los métodos moleculares no están exentos de limitaciones. Por un lado, la sensibilidad y especificidad de las técnicas moleculares es muy variada, no nos proporcionan información sobre la viabilidad de los microorganismos identificados, los ensayos clínicos que estudian el impacto de su uso en el pronóstico del paciente son escasos, y, en general, el coste de este tipo de técnicas es elevado. La Tabla 4 recoge una lista de ventajas e inconvenientes del diagnóstico mediante cultivo en contraposición a las técnicas moleculares.

Tabla 4. Ventajas y desventajas del cultivo convencional y las técnicas moleculares.

Diagnóstico microbiológico	Ventajas	Desventajas
Cultivo	✓ Sencillo y barato	✓ Tiempo de respuesta
	✓ Microorganismo viable	✓ Baja sensibilidad si antibióticos previos o muestra escasa
	✓ Permite el estudio de la sensibilidad antibiótica	✓ Bacterias y virus de difícil crecimiento
	✓ Ampliamente usados y conocidos	
Técnicas moleculares	✓ Rapidez	✓ Limitado a las dianas incluidas
	✓ No afectados por toma de antibióticos	✓ No distinguen entre microorganismo viable y no viables
	✓ Elevada sensibilidad y especificidad en general	✓ No permite el estudio fenotípico sensibilidad antibiótica
	✓ Detección de genes de resistencia	✓ Coste
	✓ Automatización	

La combinación de técnicas nuevas y convencionales permitirá la detección de los patógenos causantes de neumonía de forma más precisa y rápida. No debemos considerar las nuevas técnicas como un sustituto a las técnicas convencionales, sino como un complemento que mejorará el manejo del paciente con neumonía y reducirá la aparición de resistencias a los antibióticos.

Para valorar la implementación de nuevas técnicas moleculares en un laboratorio de Microbiología Clínica, son necesarios estudios que evalúen el impacto de estos ensayos en la evolución de los pacientes y el coste-efectividad de las mismas. Rogers *et al.* publicaron un

estudio evaluando el impacto de la incorporación de FilmArray Rapid Respiratory Panel en el pronóstico de niños ingresados por una infección respiratoria aguda (129). Se demostró que la implementación de esta técnica reducía de manera significativa la duración de la estancia hospitalaria, así como el tiempo del aislamiento y la duración del tratamiento antibiótico, siempre y cuando los resultados estuviesen disponibles en las primeras 4 h. Otro estudio analizó el uso del Film Array Respiratory panel en niños hospitalizados (130), lo que se asoció significativamente con una menor utilización de recursos médicos, incluido un menor uso de antibióticos y radiografías de tórax, y un mayor uso de medidas de aislamiento. Resultados similares se han obtenido en pacientes adultos con el uso de Filmarray (131): menor tiempo hasta el diagnóstico de gripe en comparación con los métodos convencionales y menor tiempo hasta el diagnóstico de otros virus, lo que se asoció a menor tasa de ingreso, menor estancia hospitalaria, menor duración del uso de antimicrobianos y menor número de radiografías de tórax. Un estudio más reciente (132), en el que compararon el BioFire FilmArray Pneumonia Plus Panel con los métodos convencionales para el diagnóstico de infecciones del tracto respiratorio inferior en adultos hospitalizados, presentó resultados similares: ajuste del tratamiento en más del 70% de los pacientes, incluyendo desescalada o suspensión del mismo en casi la mitad de los casos.

En otro estudio (117), se evaluó el impacto de la técnica molecular PCR-based Unyvero Pneumonia en el manejo de los pacientes con NIH grave. El ensayo Unyvero Pneumonia no solo redujo el tiempo hasta la obtención del resultado en comparación con el cultivo convencional (4 frente a 48-96 h), sino que también detectó un número importante de infecciones múltiples (55,1 frente a 8,2%). En cuanto al impacto sobre el manejo de pacientes, el tratamiento empírico inicial fue cambiado en el 67,3% de los casos basándose en los resultados del ensayo, incluida la detección de los genes de resistencia.

Respecto a los estudios de coste-efectividad de las pruebas moleculares, Leone *et al.* evaluaron el impacto económico del uso de Cepheid Xpert real-time PCR para el diagnóstico rápido de SARM en las muestras respiratorias (LBA y mini-LBA) de pacientes con sospecha de NAVM (133). Para ello, se consideraron dos posibilidades de tratamiento antibiótico empírico: uno más caro (150 euros/ día en pacientes con fallo renal) y otros más económicos

(50 euros/ día). El coste del test fue de 45 euros. Los autores demostraron que, en el caso del tratamiento empírico de 150 euros/día, la prueba era coste-efectiva independientemente de la prevalencia de SARM y que, en el caso del tratamiento de 50 euros/día, el test era coste-efectivo si la prevalencia era > 25%. Dugas *et al.* publicaron un análisis de coste-efectividad en el que se evaluaron diferentes estrategias para el manejo de los pacientes atendidos en el departamento de urgencias con una infección respiratoria aguda durante la temporada de gripe según su prevalencia (134). Durante las prevalencias más bajas de gripe (3-7%), la opción más coste-efectiva fue tratar a los pacientes según el resultado de una técnica rápida de PCR. Sin embargo, en prevalencias más altas (> 7%), la mejor estrategia era tratar a todos los pacientes. No obstante, esta última opción puede representar un factor de riesgo para el desarrollo de resistencias a los antivirales que debe evaluarse.

En otro estudio, evaluaron el uso rutinario de técnicas moleculares *Point-Of-Care* (POC) para la detección de virus respiratorios y encontraron que no se redujo la proporción de pacientes tratados con antibióticos, aunque esto fue debido a que muchos pacientes comenzaron con antibióticos antes de que los resultados de POC pudieran estar disponibles (135). Aunque no se observó una reducción en la duración del uso de antibióticos en general, más pacientes del grupo POC recibieron dosis únicas o ciclos breves de antibióticos que los pacientes del grupo de control. Las técnicas POC también se asociaron con una reducción de la duración de la estancia hospitalaria y una mejor detección de la gripe y uso de antivirales.

1.8.3 Otras opciones diagnósticas

PCR/ESI-MS.

Otra estrategia que se ha estudiado para la detección molecular de infecciones, más allá de los ensayos *multiplex*, combina la amplificación por PCR con la ionización por electrospray y espectrometría de masas (PCR/ESI-MS), con un tiempo de respuesta de unas

6 horas. Stralin *et al.* demostraron que la PCR/ESI-MS detectaba más positivos que el cultivo a partir de LBA de pacientes con NAVM, pero que la combinación de ambos métodos (cultivo y PCR/ESI-MS) sería lo ideal, ya que aumentaban mucho las identificaciones de los agentes causales de la neumonía (136). En un estudio previo en UCIs europeas obtuvieron resultados similares (137). El ensayo IRIDICA BAC (para sangre, fluidos estériles, tejidos estériles, LBA y AT) podía detectar hasta 780 bacterias, especies de *Candida* y los genes de resistencia *mecA*, *vanA*, *vanB* y *bla_{KPC}*). Como era de esperar, la PCR/ESI-MS detectaba la microbiota de las vías respiratorias junto con posibles patógenos (138). Sin embargo, este sistema comercializado como IRIDICA (Abbott) y anteriormente PLEX-ID fue discontinuado en 2017 (139). Los motivos no fueron técnicos, sino financieros y logísticos. El costo del reactivo por prueba era de 200–300 dólares americanos, y el costo de la instrumentación fue de 300 000 dólares americanos. El espacio requerido para el sistema era de unos 30 m² distribuidos en dos salas, una para preparación de muestras y extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) y la otra para PCR, desalación y espectrometría de masas. El funcionamiento del sistema IRIDICA requería un técnico de laboratorio a tiempo completo. Por estos motivos, sólo tres laboratorios en toda Europa lo implementaron en su rutina diagnóstica. Además, faltaron estudios de resultados clínicos que demostraran un beneficio claro del uso de esta tecnología.

Amplificación isotérmica.

Aunque la PCR sigue siendo la técnica de amplificación de ácidos nucleicos más extendida, requiere la extracción inicial de los ácidos nucleicos, amplificación de la secuencia de interés y posterior análisis de los productos obtenidos. Normalmente, requiere de equipos sofisticados y caros, así como de personal experimentado (140). Estos aspectos limitan el uso de la PCR en lugares con recursos limitados así como en ensayos POC. La amplificación isotérmica surgió como una alternativa prometedora a la PCR, menos compleja y más directa (141–145). Algunas de estas técnicas isotérmicas destacadas son NASBA (del inglés “Nucleic acid sequence based amplification”) (146), SDA (del inglés “Strand displacement amplification”) (147), SMART (del inglés “Sequence mediated amplification of

RNA technology”) (148), LAMP (del inglés “Loop-mediated Isothermal Amplification”) (149), o la más reciente MCDA (del inglés “Multiple cross displacement amplification”) (150). Una comparación entre todas ellas se muestra en la [Tabla 5](#). Estos métodos funcionan a una temperatura uniforme sin necesidad de variación durante el proceso, eliminando así la necesidad del uso de termocicladores. Además, las lecturas de amplificación en tiempo real son posibles con estos métodos mediante la detección de los productos amplificados midiendo la turbidez o fluorescencia, así como por inspección visual del cambio de color. Los métodos difieren entre sí en la cantidad de *primers* que utilizan, la enzima y la temperatura de amplificación. Se han desarrollado ya numerosas técnicas basadas en amplificación isotérmica, algunas ya comercializadas (151,152). Estas técnicas son buenas candidatas para su uso en ensayos POC.

Posteriormente, se describirá en detalle las características y aplicación en neumonía de una de las técnicas isotérmicas con uso más extendido en el diagnóstico microbiológico, la LAMP.

Tabla 5. Resumen de las características de los métodos de amplificación isotérmica más empleados. Adaptado de Zhao *et al.* (141).

Método	Enzimas	Primers	Temperatura (°C)	Tiempo reacción (h)	Diana	Amplificación	Eficiencia
NASBA	RT, ARNpol, RNasa H	2	41	1,5-2	ARN, ADN	ARN, ADN	10 ⁶ -10 ⁹
SDA	ADNpol, endonucleasa	2 ó 4	37	2	ADN	ADNdc	10 ⁷
SMART	ADNpol, ARNpol	2	41	4	ADN, ARN	ARN	50pM
LAMP	ADNpol (RT)	4 ó 6	60-65	<1	ADN (ARN)	ADN	10 ⁹
MCDA	ADNpol	<i>Random primers</i>	30-37	>8	ADN	ADN	10 ⁶

NASBA: *Nucleic acid sequence based amplification*; SDA: *Strand displacement amplification*; LAMP: *Loop-mediated isothermal amplification*; MCDA: *Multiple cross displacement amplification*; RT: retrotranscriptasa; ARNpol: ARN polimerasa; RNasa H: ribonucleasa H; ADNpol: AND polimerasa; ADN: ácido desoxirribonucleico; ARN: ácido ribonucleico; ADNdc: ácido desoxirribonucleico de doble cadena.

Secuenciación masiva.

En los últimos años, la aparición de las técnicas de secuenciación masiva o *Next-generation sequencing* (NGS) ha permitido obtener una información mucho más amplia, identificando los microorganismos directamente de la muestra, sean microorganismos cultivables o no, aportando al mismo tiempo información sobre genes de resistencia, virulencia y tipificación bacteriana. Los avances en las técnicas de secuenciación masiva y de computación, junto con un descenso de los costes y del tiempo en la obtención de resultados de esta tecnología, han favorecido su entrada en el campo de la Microbiología Clínica. La aplicación de esta tecnología, especialmente la de última generación, en la rutina diaria agilizaría el diagnóstico de la neumonía y permitiría un tratamiento más adecuado de forma precoz (153–157). No obstante, quedan algunas dificultades por solventar antes de incorporarlas en la rutina diaria, como es la estandarización de los protocolos, la infraestructura informática y los *pipelines* de análisis (158).

1.9 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

1.9.1 Fundamento de la LAMP

La LAMP, amplificación isotérmica mediada por bucle, es un método de amplificación de ácidos nucleicos isotérmico desarrollado y publicado por primera vez en el año 2000 (149). Esta técnica tuvo gran aceptación porque es muy específica, sensible y rápida. Emplea una ADN polimerasa con capacidad de desplazamiento de cadena, siendo la más frecuente el enzima de *Bacillus stearothermophilus* (Bst). Puede llegar a amplificar hasta 10^9 copias en una hora (149). El ensayo LAMP requiere como mínimo cuatro *primers* específicos que reconocen un total de seis secuencias diferentes del ADN diana: *Backward inner primer* (BIP) y *Forward inner primer* (FIP) constituyen los *primers* internos, mientras que *Backward outer* (B3) y *Forward outer* (F3) son los externos. El ensayo puede incluir además dos *primers* opcionales que permiten acelerar la amplificación: *Loop forward* (LF) y *Loop backward* (LB). El procedimiento de la LAMP consiste, en general, en un paso único de amplificación entre 60 y 65 °C durante una hora.

Existen diferentes programas informáticos para el diseño de los *primers* de un ensayo LAMP. Algunos ejemplos son el programa de pago de Optigene (Inglaterra) (<http://www.optigene.co.uk/lamp-designer/>) o el programa gratuito de Eiken Chemical Company (Japón), PrimerExplorer (Versión 5, <https://primerexplorer.jp/e/>).

La amplificación de ácidos nucleicos mediante LAMP comienza con la unión de FIP (F2) a la región F2c de la secuencia diana, sintetizándose la secuencia complementaria (**Figura 5**). Esta hebra se desplaza cuando F3 se une a F3c en la secuencia diana e inicia la síntesis, lo que resulta en una cadena desplazada unida a FIP con el extremo con estructura de bucle. BIP inicia la síntesis de otra cadena usando la hebra unida a FIP como molde. El desplazamiento de la hebra sintetizada a través del *primer* B3 resulta en una hebra con estructura de bucle en ambos extremos. La segunda etapa, la fase cíclica, utiliza las hebras sintetizadas en la fase inicial con sus bucles para realizar ciclos de amplificación repetidos y producir una gran cantidad de hebras amplificadas de varias longitudes, copias de la secuencia diana.

La detección de los amplicones puede realizarse mediante electroforesis en gel, detección de fluorescencia o mediante la turbidez generada por el pirofosfato de magnesio que se acumula como producto final de la amplificación. Se puede realizar también una detección a tiempo real de la amplificación empleando intercalantes fluorescentes como el SYBR Green. Los productos amplificados forman bandas que simulan una escalera en la electroforesis en gel de agarosa. La **Tabla 6** resume las principales características de los métodos de detección de los amplicones generados mediante LAMP.

Una de las principales ventajas de esta técnica es que se ve mucho menos afectada que la PCR por los posibles inhibidores presentes en muestras clínicas (159). Esto permite evitar la extracción y purificación de los ácidos nucleicos, lo que acortaría aún más el tiempo de obtención de resultados.

Figura 5. Mecanismo del método LAMP. Se emplean 4 primers (F1c-F2, F3, R1c-R2, R3): F1 es complementario a F1c (c indica que la hebra es complementaria). Copiado de la referencia (149) con permiso de los autores; copyright 2000, Oxford University press.

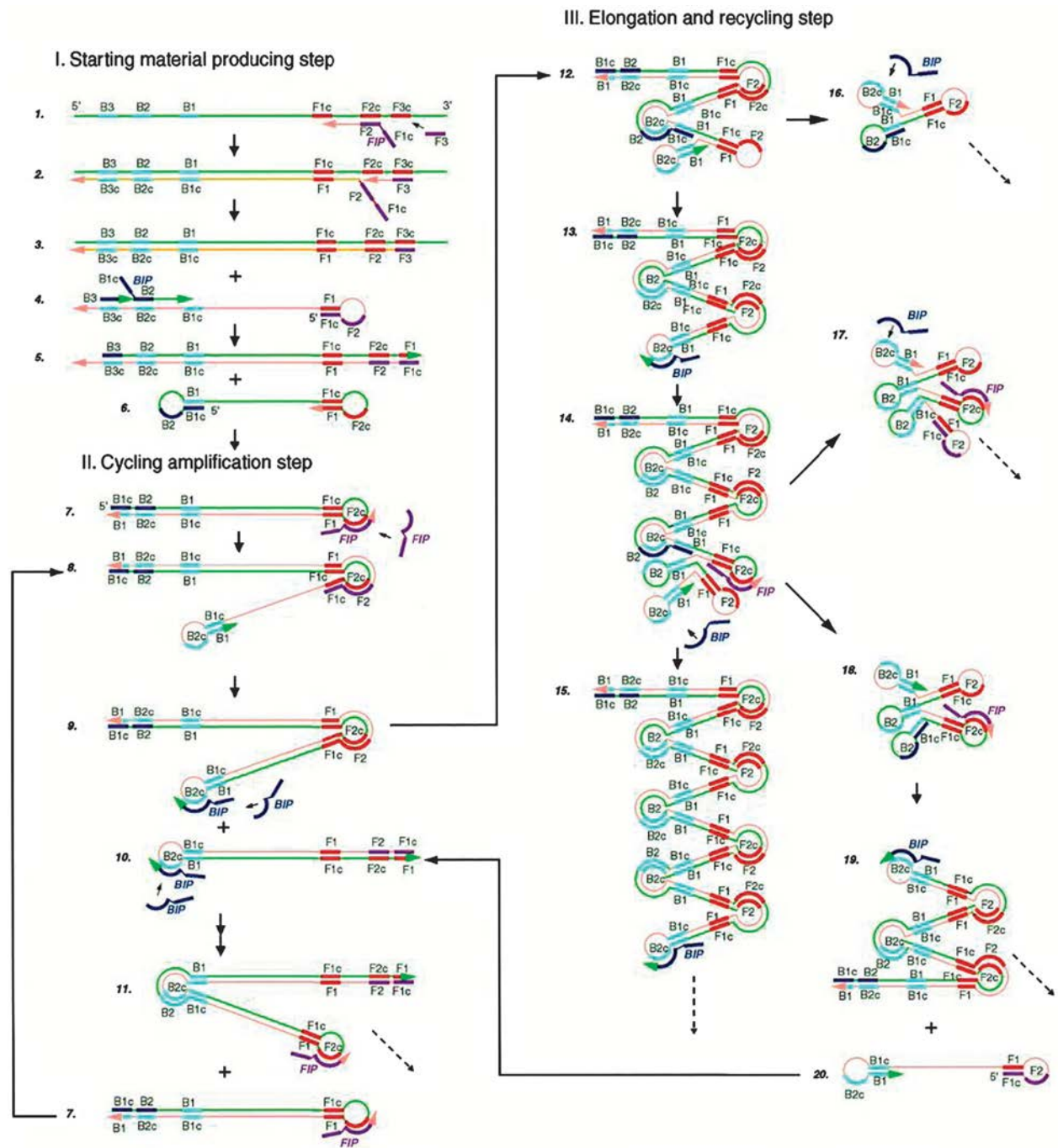


Tabla 6. Comparación de métodos de detección de amplificación para LAMP. Adaptado y actualizado de (160).

Método	Fundamento	Ventajas	Desventajas	Cualitativa/ Cuantitativa	Directo/ Indirecto	Respuesta	Límite de detección (Ref)
Simple vista (precipitado blanco)	Precipitación de pirofosfato de magnesio	Simple, sin riesgo de contaminación	Subjetivo, menos sensible	Cualitativa	Indirecto	Final	6x10 ⁴ UFC/mL (161)
Simple vista (intercalante)	Intercalante fluorescente, añadido al final de la reacción	Simple, elevada sensibilidad	Riesgo de contaminación cruzada	Cualitativa	Indirecto	Final	1 copia/μl (162)
Simple vista (colorimétrico)	Indicador colorimétrico, añadido antes de la reacción	Simple, sin riesgo de contaminación, elevada sensibilidad	Inhibición de la amplificación	Cualitativa	Indirecto	Final/ Tiempo real	30 UFC/mL (163)
Electroforesis	Electroforesis en gel	Información sobre tamaño de amplicones, elevada sensibilidad	Laborioso, riesgo de contaminación	Cualitativa	Directo	Final	100 fg (164)
Turbidez en tiempo real	Precipitación de pirofosfato de magnesio	Automatización, sin riesgo de contaminación, no requiere sonda/indicador	Se requieren muestras homogéneas y transparentes	Cualitativa/ Cuantitativa	Indirecto	Tiempo real	6 UFC (165)

Fluorescencia tiempo real	Intercalante fluorescente unido a amplicones	Automatización, sin riesgo de contaminación, rápida respuesta	Inhibición de la amplificación	Cualitativa/ Cuantitativa	Directo	Tiempo real	7 UFC (166); 1 copia (167)
Sensor electroquímico	Indicador electroactivo que interacciona con amplicones	Automatización, no afectado por opacidad de la muestra	Inhibición de la amplificación, riesgo de contaminación cruzada	Cualitativa/ Cuantitativa	Indirecto	Final/ Tiempo real	24 UFC (168)
Biosensor electroquímico	Indicador electroactivo, hibridación	Automatización, no afectado por opacidad de la muestra, elevada especificidad	Laborioso, riesgo de contaminación cruzada	Cualitativo	Directo	Final	-
LFD	Cromatografía, hibridación	Elevada especificidad, no requiere instrumento especializado	Laborioso, riesgo de contaminación cruzada	Cualitativo	Directo	Final	2,4 copias (169)
ELISA	Hibridación, inmunorreconocimiento	Elevada especificidad, no requiere instrumento especializado	Laborioso, riesgo de contaminación cruzada	Cualitativo	Directo	Final	1 copias (170)

UFC: unidades formadoras de colonias; LFD: *lateral flow device*, ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

1.9.2 Variantes de LAMP

LAMP Multiplex.

Aunque los ensayos isotérmicos *singleplex* (es decir, ensayos para detectar una diana por reacción) son robustos y representan la mayoría de las técnicas isotérmicas publicadas hasta la fecha, resulta de gran interés poder amplificar y detectar simultáneamente más de una diana, lo que se conoce como LAMP *multiplex* (mLAMP) (171). Aunque no es un diseño sencillo, dado el elevado número de *primers* a incluir, hay algunos trabajos que lo describen. Las distintas dianas pueden identificarse basándose en la temperatura de *melting* (172,173), el patrón de bandas tras una electroforesis (174), el uso de enzimas de restricción (175) o mediante el uso de sondas con distintos fluoróforos (176,177). Otra opción para detectar las distintas dianas es acoplar la LAMP a un sistema de detección basada en un ensayo inmunoenzimático en microgotas sobre nitrocelulosa (Dot-ELISA) (178).

LAMP cuantitativa y LAMP digital (dLAMP).

Uno de los principales retos en el diagnóstico de la neumonía es discernir una verdadera infección de una colonización. Para el cultivo se han establecido unos valores de referencia, pero en el caso de las técnicas moleculares no es tan sencillo, teniendo en cuenta que además estos métodos detectan tanto microorganismos viables como no viables. Para solucionar el primer problema, algunos trabajos han relacionado los valores de Ct con la carga microbiana y han establecido sus valores umbrales. En un estudio que evaluó el uso del sistema Xpert Carba-R en muestras de LBA directamente se propuso un valor de corte para distinguir entre infección ($Ct \leq 24.7$ que correspondía a un recuento de 10^5 UFC/mL) y colonización ($Ct > 26.9$ correspondiente a un recuento de $< 10^4$ UFC/mL) (179).

Tanto en el caso de la PCR cuantitativa (qPCR) como de la LAMP cuantitativa (qLAMP), lo que se consigue es una cuantificación relativa, ya que es necesaria una curva estándar. En este sentido, se han desarrollado métodos de amplificación digital de ácidos

Introducción

nucleicos (180) como la PCR digital (dPCR) y la LAMP digital (dLAMP), que son técnicas cuantitativas y de alta sensibilidad. La dLAMP se ha aplicado en la detección de diversos patógenos (181–185) con alta precisión, sensibilidad, especificidad, así como una mejor tolerancia a los inhibidores frente a la dPCR. Se ha evaluado esta técnica también para determinar el fenotipo de sensibilidad a los antibióticos de *E. coli* directamente a partir de muestras clínicas de orina en menos de 30 minutos (186).

LAMP como POC.

Hay disponibles instrumentos miniaturizados para la detección de los productos de amplificación de LAMP, como Genie II (OptiGene Horsham, Reino Unido) (Figura 6). Se considera un termociclador portátil ya que es ligero, fácilmente transportable por un individuo y funciona con batería (187,188). Chen *et al.* (189) diseñaron un dispositivo microfluídico POC para la detección simultánea de varias dianas mediante LAMP. Estos avances, entre otros aspectos, permiten que este tipo de técnicas puedan emplearse en áreas con recursos limitados o que no cuenten con personal especializado.

Figura 6. Instrumento Genie II (Optigene): detector de fluorescencia a tiempo real con dos módulos para el procesamiento de dos muestras al mismo tiempo.



Existen numerosos ejemplos de las posibilidades que presenta la técnica LAMP para su uso en el diagnóstico de enfermedades infecciosas en campo. Patel *et al.* evaluaron el uso en campo de un dispositivo portátil (RealAMP) que integra una LAMP dirigida al gen 18S del ARN ribosomal con la detección de fluorescencia en tiempo real para el diagnóstico de malaria (190). La técnica LAMP se presenta como una alternativa muy prometedora para el diagnóstico de infecciones en el contexto de brotes, como ha sido el caso del virus Ebola (191) o del SARS-CoV-2 (192,193). Otras posibles aplicaciones de la LAMP en campo incluirían el diagnóstico de tuberculosis (194,195), leishmaniasis (196), esquistosomiasis (197), arbovirosis (198), infecciones gastrointestinales (199,200), gripe (201) o VIH (202), entre otras.

1.9.3 LAMP en el diagnóstico de la neumonía

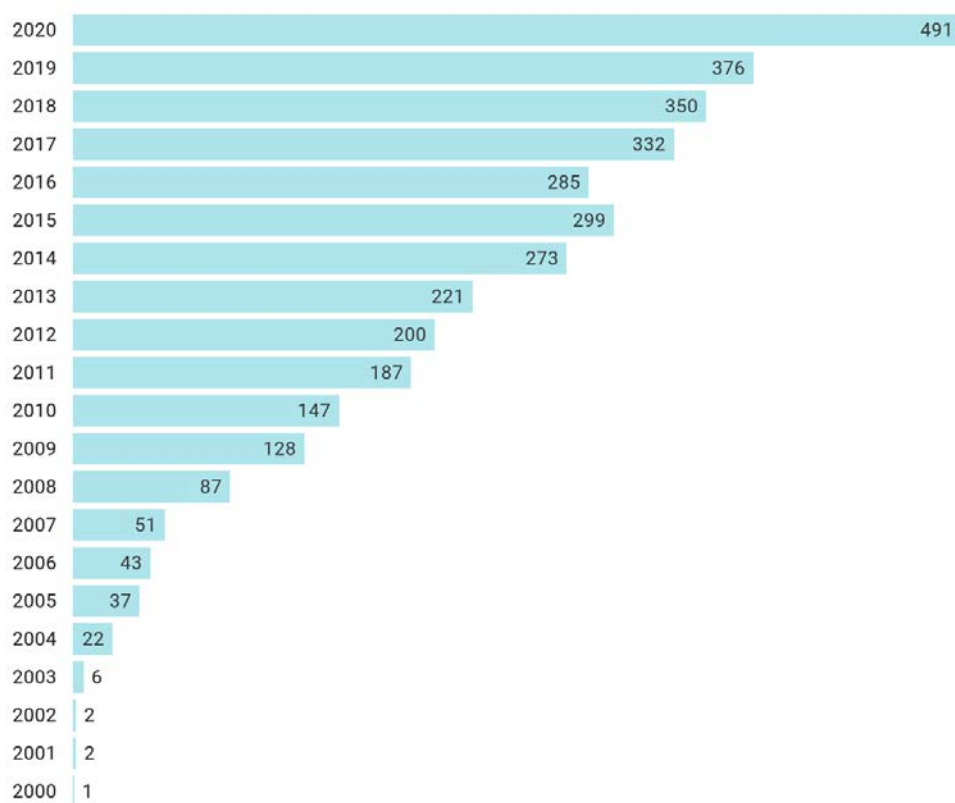
Desde su descripción en el año 2000, el número de publicaciones en Pubmed sobre LAMP ha aumentado año tras año (Figura 7), y con ello el número de aplicaciones de esta técnica en el campo de la Microbiología Clínica y las Enfermedades Infecciosas (203). Se han diseñado ensayos de LAMP para cualquier tipo de patógeno, incluidas bacterias, virus, hongos y parásitos (204,205). En concreto, son numerosos los autores que han desarrollado y evaluado esta técnica para su uso en el diagnóstico de las infecciones respiratorias y la neumonía.

Kang *et al.* (206) realizaron un estudio en China en el que compararon la qPCR con el cultivo en pacientes con infección de vías respiratorias bajas. En este estudio utilizaron un kit de extracción previo a la realización de la LAMP. Compararon la qLAMP con el cultivo en la detección de 8 bacterias (*A. baumannii*, *E. coli*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. maltophilia* y *S. pneumoniae*), incluyendo casi 3 000 esputos de pacientes con infección de vías respiratorias bajas. La sensibilidad de la qLAMP fue entre 2-10 veces mayor que con el cultivo. Wang *et al.* (207) publicaron un trabajo similar en pacientes con NIH, pero en este caso incluyeron también tres patógenos atípicos (*L. pneumophila*, *M. pneumoniae* y *C. pneumoniae*). Hou *et al.* (208) van un poco más allá y en su LAMP son capaces de identificar SARM e incluyen otra diana adicional que es *Mycobacterium tuberculosis*

Introducción

complex. Otros trabajos se centran en el diagnóstico mediante LAMP de los agentes atípicos causantes de neumonía (209–212). Se han publicado también trabajos que han evaluado el uso de LAMP para el diagnóstico de infecciones respiratorias por virus (213–218).

Figura 7. Número de registros en Pubmed desde el año 2000 hasta el año 2020 para “Loop-mediated isothermal amplification”.



Creado con Datawrapper

En lo que respecta a la detección de genes de resistencia, se han publicado varios trabajos en los que hacen uso de la técnica LAMP para este propósito. Cheng *et al.* (219) desarrollaron y evaluaron una LAMP para detectar los genes codificantes de carbapenemasas más comunes (*bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} y *bla*_{NDM}). La técnica se validó con cepas de referencia y posteriormente se evaluó con 22 cepas clínicas. En ambos casos se extrajo previamente el ADN. La concordancia entre PCR y LAMP fue del 100%, con un límite de detección para LAMP de 10 UFC/reacción en el caso de la detección de fluorescencia en

tiempo real y de 100 UFC/reacción en el caso de la detección visual. Existen también kits comerciales preparados para la detección de genes de resistencia directamente de colonias bacterianas o de muestra clínica. Un ejemplo es el sistema Eazyplex® SuperBug CRE (Amplex-Diagnostics GmbH) que combina la LAMP con la detección fotométrica en tiempo real del material amplificado para la detección rápida y simple de BLEE y genes codificantes de carbapenemasas (*bla*_{CTXM-1}, *bla*_{CTXM-9}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48} y *bla*_{OXA-181}).

1.10 Biomarcadores

El papel de los biomarcadores y su correlación con la gravedad de la infección está siendo objeto de creciente interés. Se han analizado numerosos biomarcadores como ayuda en la predicción tanto de la severidad como de la mortalidad en pacientes con neumonía (220). Hay que tener en cuenta que tienen un papel limitado en el diagnóstico de la neumonía, ya que ninguno de ellos es específico para la neumonía, pues se observa un aumento de estos en otras infecciones bacteriana sistémicas (221). Además, se requieren más estudios y siempre se usarán como un complemento a la práctica clínica habitual.

1.10.1 Definición de biomarcador

Un biomarcador es una característica definida que se mide como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas a una exposición o intervención (222). Podemos distinguir entre biomarcadores de diagnóstico, de pronóstico, de predicción, de evolución y de respuesta a un tratamiento o intervención.

1.10.2 Biomarcadores en el manejo de la neumonía

Los biomarcadores pueden contribuir al manejo de la neumonía en diferentes aspectos (223):

- Diagnosticar la neumonía
- Determinar la gravedad de la neumonía

Introducción

- Estratificar el riesgo de neumonía
- Marcar el inicio y la duración/interrupción de la antibioticoterapia
- Determinar el pronóstico

Marcadores clásicos como la proteína C reactiva (CRP, del inglés “C-reactive protein”; se mantiene el acrónimo en inglés para distinguirlo de la PCR) aumenta en la mayoría de los pacientes con NAC, pero lo mismo ocurre en otras tantas patologías. Por ello, se considera un marcador altamente inespecífico (224). Sin embargo, la CRP es altamente eficaz como medio para evaluar la respuesta al tratamiento y el pronóstico (225). Se ha observado una mortalidad inferior al 1% en pacientes donde la CRP ha disminuido en un 50% o más en el día 3 o 4 (226). La combinación de CRP junto con escalas de gravedad, como PSI y CURB-65, aumenta la capacidad predictiva de mortalidad a 30 días (227). En lo que respecta a los leucocitos, tanto la elevación como la disminución de su recuento se utilizan para ayudar en el diagnóstico de infección. Además, la relación entre el recuento de neutrófilos y linfocitos puede proporcionar información sobre el tipo de respuesta (223). Por ejemplo, la leucopenia se ha asociado con un aumento de la mortalidad. Sin embargo, al igual que ocurre con la CRP, es un marcador inespecífico (228).

La procalcitonina (PCT) ha sido el biomarcador más estudiado ya que aumenta rápidamente en presencia de infección bacteriana, así como algunas citoquinas inflamatorias que incluyen IL-1 β , IL-6, y TNF- α . Las infecciones virales no generan una respuesta tan fuerte en la PCT, lo que sugiere que se podría utilizar para identificar infecciones que puedan responder a tratamiento antibacteriano (229) y guiar este tratamiento (230–233). Sin embargo, la última guía ATS/IDSA no recomienda el uso de PCT para determinar la necesidad de inicio de terapia antibacteriana (4). Por el contrario, se recomienda iniciar la terapia antibiótica empírica en adultos con sospecha clínica y NAC confirmada radiológicamente, independientemente de los niveles séricos iniciales de PCT. Sin embargo, sí que se ha visto que niveles plasmáticos más elevados de PCT, IL-6 y CRP en los primeros días de tratamiento de la neumonía se asocian a fallo en el tratamiento (234). Por otro lado, estos marcadores de inflamación también podrían servir para identificar a aquellos pacientes que requieren de ingreso en UCI (235).

Se investigan otros biomarcadores como la neopterina, copeptina y pro-péptido natriurético atrial (14). La pro-adrenomedulina parece jugar un papel importante en la evaluación del pronóstico de los pacientes con neumonía (236).

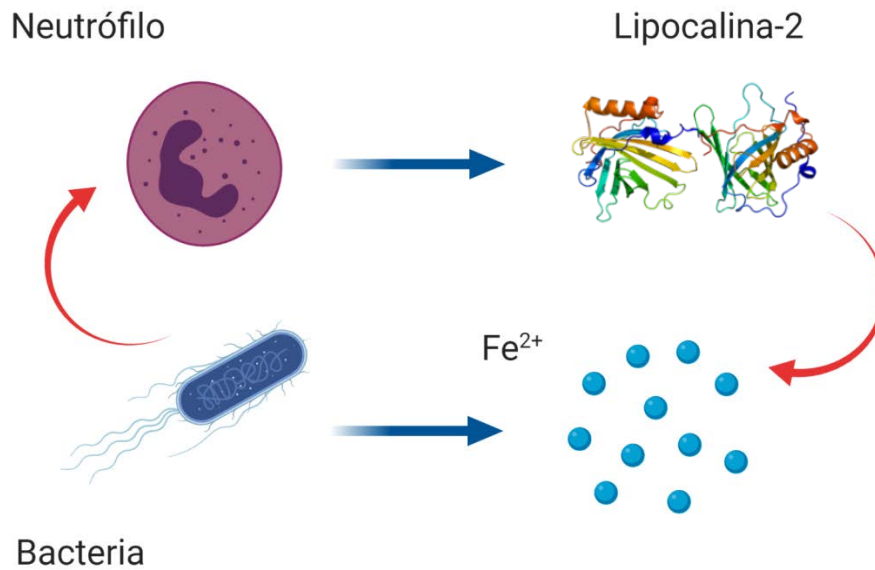
Existen ya sistemas POC para discernir infección respiratoria aguda viral y bacteriana. Un ejemplo es FebriDx® (237,238), una inmunocromatografía que detecta la PCR y la proteína A de resistencia del Myxovirus, proteína inducida durante una infección vírica (239).

En definitiva, hay que tener en cuenta que se requieren más estudios para validar el uso de estos biomarcadores y, además, que el coste de su determinación puede ser elevado y que no siempre se puede contar con un resultado inmediato (14). Otro aspecto importante a tener en cuenta es que el tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas influye en el uso de los biomarcadores, ya que el estado inflamatorio va modificándose (240). Por ahora, no se recomienda el uso de biomarcadores para decidir el inicio del tratamiento antibióticos en pacientes con NIH/NAVM (19) ni como indicadores de pronóstico (17).

1.10.3 Lipocalina-2

La lipocalina-2 (LCN2), también conocida como lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL, del inglés “neutrophil gelatinase-associated lipocalin”), es una proteína que participa en la respuesta inmune innata: mediante el secuestro del hierro compite con las bacterias, limitando así su crecimiento (241). El hierro es esencial para las bacterias pero la concentración de hierro requerida para su crecimiento en un huésped humano es mucho mayor que la concentración de hierro libre disponible. Para superar este déficit, muchas bacterias secretan proteínas de unión al hierro llamadas sideróforos, que debido a su alta afinidad por el hierro secuestran el Fe^{3+} de las proteínas de unión al hierro del huésped, como la lactoferrina y la transferrina. Para evitar la adquisición de hierro bacteriano a través de los sideróforos, los mamíferos emplean la LCN2. Al encontrarse con bacterias invasoras, los receptores tipo Toll en las células inmunes estimulan la síntesis y secreción de LCN2, que limita el crecimiento bacteriano secuestrando sideróforos que contienen hierro (**Figura 8**).

Figura 8. Papel de la lipocalina-2 ante una infección. Elaborado con Biorender.com.



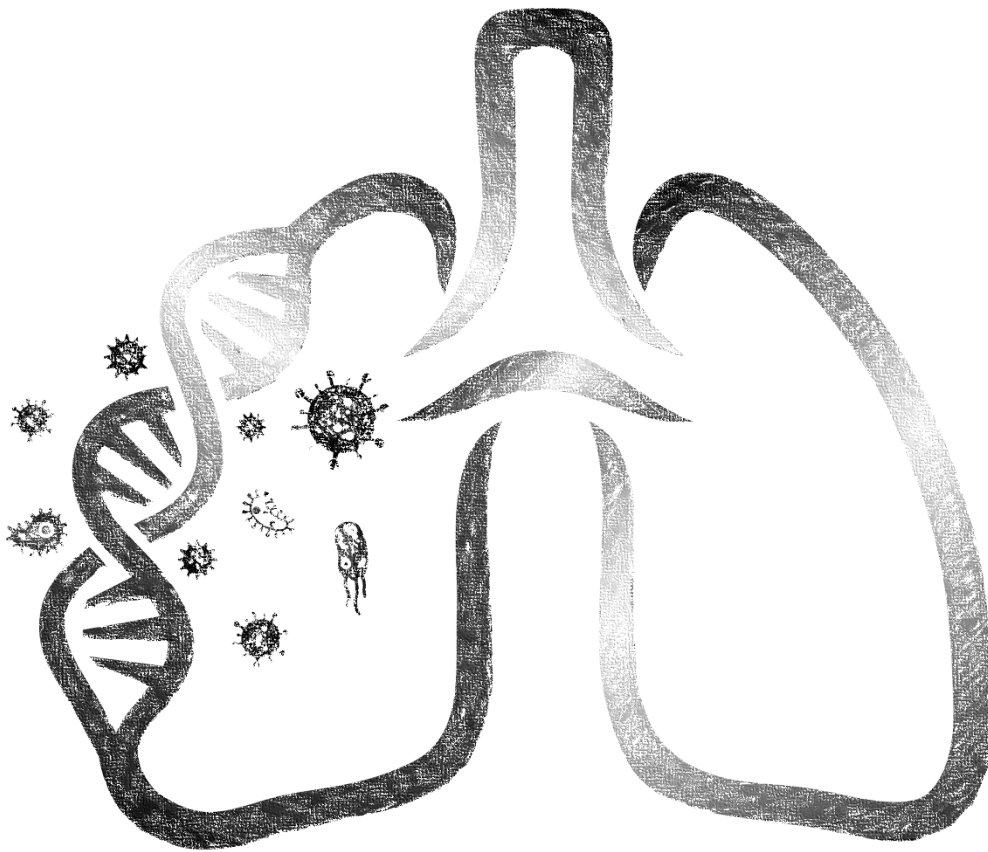
Como proteína de fase aguda, la LCN2 se ha vuelto cada vez más relevante en los últimos años como un posible biomarcador clínico en enfermedades inflamatorias. Los niveles de LCN2 en los fluidos biológicos son generalmente bajos y aumentan cuando hay inflamación, lo que indica un elevado potencial de su uso como biomarcador del inicio y la progresión de la enfermedad. Aunque su principal aplicación es como biomarcador de daño renal (242), también se ha estudiado su papel como biomarcador en otras patologías (243,244), incluida la neumonía (245–248).

Aunque en el tejido pulmonar humano normal la LCN2 está presente constitutivamente, su secreción aumenta ante la presencia de bacterias patógenas (249). El papel de la LCN2 en la defensa contra las infecciones virales no se ha definido claramente, con solo un pequeño número de estudios publicados. Los niveles de LCN2 en suero permiten discriminar entre infecciones virales y bacterianas con una mayor sensibilidad y especificidad que la CRP en una muestra de pacientes con infecciones agudas (250,251).

Huang *et al.* (247) llevaron a cabo un estudio proteómico basado en espectrometría de masas para identificar y validar marcadores de gravedad en niños de Gambia con neumonía. Encontraron que la LCN2 fue el mejor biomarcador proteico de neumonía grave

y altamente predictivo de bacteriemia y probable etiología bacteriana. Se ha publicado también que la concentración de LNC2 aumenta con la gravedad de la NAC, que es significativamente mayor en los no supervivientes que en los supervivientes, y que es un predictor pronóstico independiente en pacientes con NAC (246). En un estudio reciente (248), han evaluado el papel de la LCN2 como complemento en el diagnóstico de infecciones respiratorias de vías bajas. Han observado que es mejor que la IL-6 y que el aumento en sus niveles podría ser causado principalmente por infección y no tanto por enfermedades subyacentes como EPOC, asma, enfermedades pulmonares intersticiales o bronquiectasias.

JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO E HIPÓTESIS



2. Justificación del trabajo e hipótesis

Las infecciones del tracto respiratorio inferior se sitúan como la cuarta causa de muerte a nivel mundial, siendo la primera en los países en vías de desarrollo y la sexta y única causa infecciosa dentro de las diez primeras en países desarrollados. La NIH es una de las principales causas de infección hospitalaria. En concreto, la NAVM es la primera causa de infección en los pacientes con ventilación mecánica, con una morbi-mortalidad asociadas muy elevadas. Los pacientes con NAVM presentan periodos más prolongados con ventilación mecánica, así como de estancia en UCI y en el hospital. La implementación de diferentes estrategias preventivas ha permitido disminuir los casos de NAVM, pero la incidencia sigue siendo muy alta.

La NIH/NAVM está frecuentemente causada por bacterias aerobias Gram-negativas, como *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli* y *Acinetobacter* spp; mientras que *S. aureus* es el patógeno Gram-positivo más frecuente. Además, la NIH/NAVM puede ser polimicrobiana, lo que complica el diagnóstico y el tratamiento. Cabe señalar que muchas de estas bacterias presentan altos niveles de resistencia a los antibióticos. Con respecto a los virus, el VHS-1 y el CMV pueden reactivarse en pacientes críticos y causar neumonía.

Desafortunadamente, el diagnóstico de la NIH/NAVM es complicado y no hay una prueba de referencia totalmente fiable. En el caso de la NAVM, los signos y síntomas de la neumonía, como fiebre, taquicardia, leucocitosis y secreciones purulentas, son frecuentes en pacientes con ventilación mecánica y no son específicos de la NAVM. Además, los cambios radiográficos son difíciles de interpretar en este grupo de pacientes. Por lo tanto, es necesario confirmar la sospecha clínica de NIH/NAVM a través del cultivo microbiológico de las secreciones pulmonares. Sin embargo, el diagnóstico microbiológico también presenta varias dificultades.

La aplicación de técnicas de diagnóstico rápido para identificar patógenos microbianos parece tener un gran impacto en el tratamiento de NIH/NAVM, reduciendo los tratamientos antimicrobianos inapropiados o innecesarios y la mortalidad en estos pacientes. Las técnicas

Justificación del trabajo e hipótesis

moleculares han permitido un diagnóstico más rápido, especialmente en el caso de las infecciones virales. Las técnicas moleculares tienen la ventaja de ser más rápidas que el cultivo, permitir la detección de los agentes causales aunque el paciente esté recibiendo antibióticos y ser capaz de cuantificar la concentración bacteriana en la muestra. Sin embargo, en general son técnicas relativamente caras y detectan un número limitado de microorganismos.

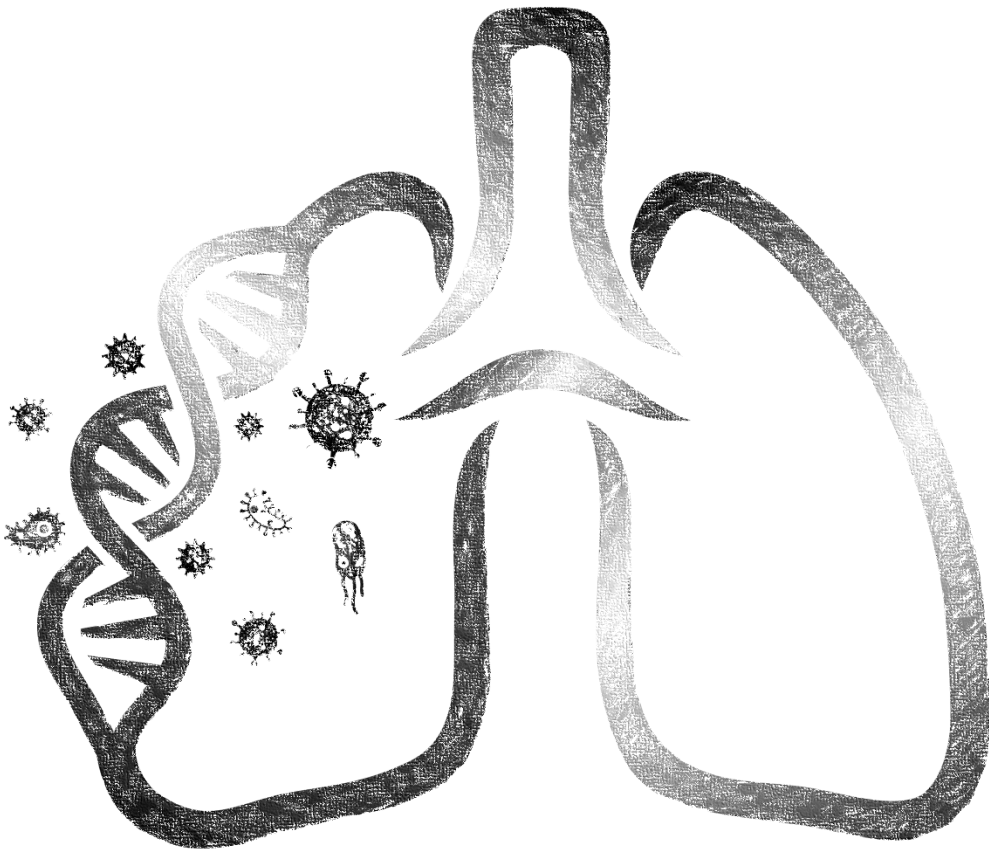
La técnica de amplificación isotérmica tipo LAMP es un método de amplificación de ácidos nucleicos a temperatura constante, rápido, simple, y barato. Esta técnica es muy sensible y específica, y existen numerosas publicaciones sobre su uso en una amplia gama de aplicaciones. La técnica LAMP se ha utilizado en la identificación de patógenos respiratorios, con resultados prometedores.

Por otro lado, el uso de biomarcadores se presenta como una herramienta adicional para mejorar el diagnóstico de la neumonía. La LCN2 ha demostrado ser un buen biomarcador etiológico (discrimina neumonía de origen bacteriano y vírico) y pronóstico (asociado a neumonía grave) en niños.

Hipótesis

1. La técnica de amplificación isotérmica tipo LAMP para el diagnóstico de la neumonía permite identificar de manera rápida los principales agentes causantes de la NIH/NAVM.
2. La técnica LAMP permite una rápida identificación de los principales genes que codifican determinantes de resistencia a antibióticos en los casos de NIH/NAVM.
3. La LCN2 es un buen marcador etiológico y pronóstico de la neumonía.

OBJETIVOS



3. Objetivos

Objetivos Generales

1. Diseño y evaluación de una LAMP para la identificación de las principales bacterias y virus implicados en la NIH/NAVM directamente de muestras respiratorias.
2. Evaluación de una técnica LAMP para la detección de beta-lactamasas en bacterias causantes de NIH/NAVM.
3. Evaluación de la LCN2 como biomarcador de neumonía.

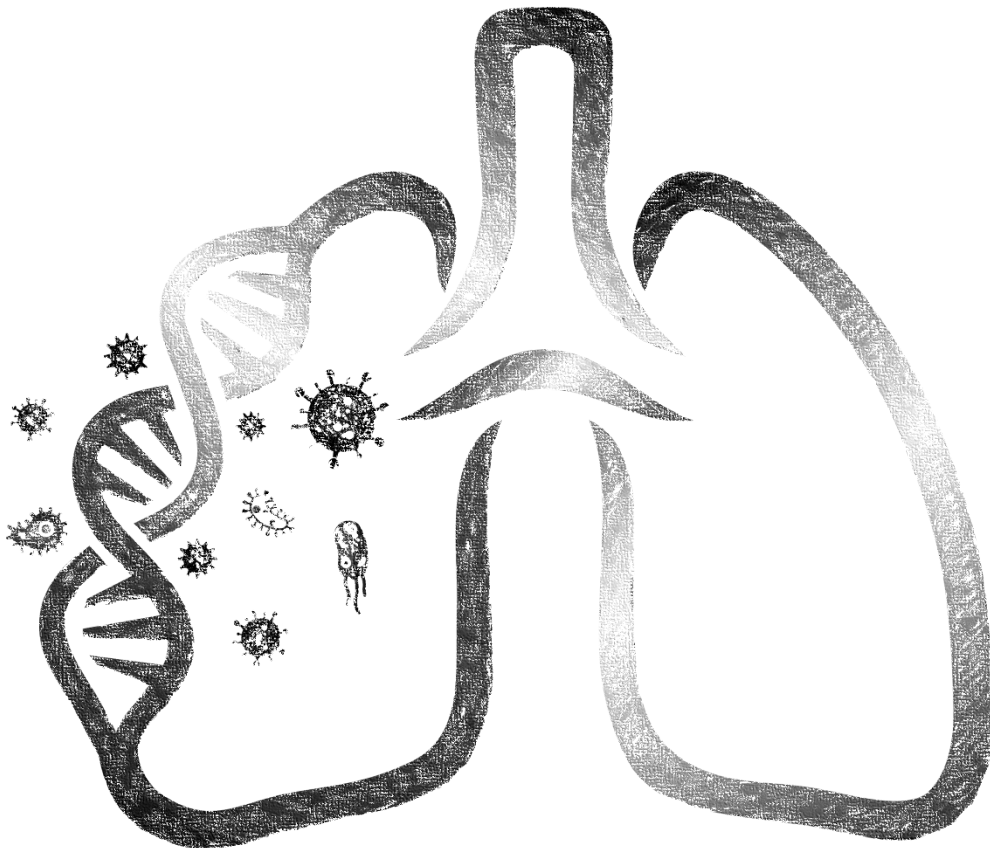
Objetivos Específicos

1. Diseño y evaluación de una LAMP para la identificación de las principales bacterias y virus implicados en la NIH/NAVM directamente en muestras respiratorias.
 - 1.1. Diseño y evaluación de una LAMP para la identificación de las principales bacterias implicadas en la NIH/NAVM directamente de muestras respiratorias.
 - 1.2. Desarrollo y evaluación de una LAMP para la identificación de los principales virus implicados en la NIH/NAVM directamente de muestras respiratorias.
2. Evaluación de una técnica LAMP para la detección de beta-lactamasas en bacterias causantes de NIH/NAVM.
 - 2.1. Evaluación de una técnica LAMP para la detección de beta-lactamasas a partir de cepas y de muestras positivas para *A. baumannii* resistente a carbapenémicos.
 - 2.2. Evaluación de una técnica LAMP para la detección de resistencias a partir de cepas y de muestras positivas para *Enterobacterales* productores de BLEE y/o carbapenemasas.

Objetivos

3. Evaluación de la LCN2 como biomarcador de neumonía.
 - 3.1. Evaluar la LCN2 para identificar la NAVM en modelo animal.
 - 3.2. Evaluar la LCN2 para diferenciar la NAC vírica de la bacteriana, así como relacionarla con la gravedad y pronóstico de la NAC.

RESULTADOS



4. Resultados

Diseño y evaluación de una LAMP para la identificación de las principales bacterias y virus implicados en la NIH/NAVM directamente de muestras respiratorias.

Artículo 1.

Vergara A*, Boutal H*, Ceccato A, López M, Cruells A, Bueno-Freire L, Moreno-Morales J, Puig de la Bellacasa J, Castro P, Torres A, Marco F, Casals-Pascual C, Vila J. *Assessment of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid detection of pathogenic bacteria from respiratory samples in patients with hospital-acquired pneumonia. Microorganisms 2020; 8: 103. *Coautores*

Hipótesis

La identificación rápida del agente causante de la NIH permitirá una administración más temprana de un antibiótico más apropiado y mejorará la evolución de estos pacientes.

Objetivos

Desarrollar un protocolo rápido para identificar los principales microorganismos involucrados en la NIH mediante una técnica de LAMP directamente a partir de muestras respiratorias.

Resultados

Material y métodos

En primer lugar, se diseñó un procedimiento rápido (<30 min) para extraer el ADN de muestras de LBA, AT y BAS. Se evaluó una LAMP específica para *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* y *A. baumannii*. La LAMP se realizó a 65°C durante 30-40 min. Se analizaron un total de 58 muestras positivas de LBA y 83 AT/BAS.

Resultados

Los límites de detección variaron según el microorganismo detectado. La validación del ensayo LAMP con muestras de LBA presentó una especificidad del 100% y una sensibilidad del 86,3% (valor predictivo positivo del 100% y valor predictivo negativo del 50%) en comparación con el cultivo. Por otro lado, para las muestras de AT/BAS, el ensayo presentó un 100% de especificidad, 94,6% de sensibilidad, 100% de valor predictivo positivo y 69,2% de valor predictivo negativo. El tiempo de respuesta, incluida la preparación de muestras y LAMP, fue de aproximadamente una hora.

Conclusiones

El método LAMP puede usarse para detectar las bacterias más frecuentes que causan la NIH. Es un ensayo simple, barato, sensible, específico y rápido.



Article

Assessment of a Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Rapid Detection of Pathogenic Bacteria from Respiratory Samples in Patients with Hospital-Acquired Pneumonia

Andrea Vergara ^{1,†} , Hervé Boutal ^{2,†}, Adrián Ceccato ^{3,4}, Míriam López ¹, Adrià Cruells ⁵, Leticia Bueno-Freire ^{3,4}, Javier Moreno-Morales ⁶ , Jorge Puig de la Bellacasa ¹, Pedro Castro ^{5,7} , Antoni Torres ^{3,4,5} , Francesc Marco ^{1,6} , Climent Casals-Pascual ^{1,6} and Jordi Vila ^{1,6,*}

¹ Department of Clinical Microbiology, CDB, Hospital Clínic of Barcelona, University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain; VERGARA@clinic.cat (A.V.); mlopezv@clinic.cat (M.L.); jpuig@clinic.cat (J.P.d.l.B.); fmarco@clinic.cat (F.M.); ccasals@clinic.cat (C.C.-P.)

² Service de Pharmacologie et Immunoanalyse (SPI), CEA, INRA, Laboratoire d'Études et de Recherches en Immunanalyse, Université Paris-Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette, France; Herve.BOUTAL@cea.fr

³ Pulmonary and Critical Care Unit, Respiratory Institute, Hospital Clínic, 08036 Barcelona, Spain; aceccato@clinic.cat (A.C.); bueno@clinic.cat (L.B.-F.); atorres@clinic.cat (A.T.)

⁴ Biomedical Research Centre in Respiratory Diseases (CibeRes, CB06/06/0028), Institut d'Investigacions Biomèdiques Agust Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain

⁵ Department of Medicine, School of Medicine, University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain; acuells@clinic.cat (A.C.); pcastro@clinic.cat (P.C.)

⁶ ISGlobal, Hospital Clínic-Universitat de Barcelona, 08036 Barcelona, Spain; javier.moreno@isglobal.org

⁷ Medical Intensive Care Unit, Hospital Clínic, 08036 Barcelona, Spain

* Correspondence: jvila@clinic.cat; Tel.: +34-93-2275522

† These authors contributed equally to this work.

Received: 5 December 2019; Accepted: 8 January 2020; Published: 11 January 2020



Abstract: Rapid identification of the causative agent of hospital-acquired pneumonia (HAP) will allow an earlier administration of a more appropriate antibiotic and could improve the outcome of these patients. The aim of this study was to develop a rapid protocol to identify the main microorganisms involved in HAP by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) directly from respiratory samples. First of all, a rapid procedure (<30 min) to extract the DNA from bronchoalveolar lavage (BAL), endotracheal aspirate (EA) or bronchoaspirate (BAS) was set up. A specific LAMP for *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Acinetobacter baumannii* was performed with the extracted solution at 65 °C for 30–40 min. Overall, 58 positive BAL and 83 EA/BAS samples were tested. The limits of detection varied according to the microorganism detected. Validation of the LAMP assay with BAL samples showed that the assay was 100% specific and 86.3% sensitive (positive predictive value of 100% and a negative predictive value of 50%) compared with culture. Meanwhile for BAS/EA samples, the assay rendered the following statistical parameters: 100% specificity, 94.6% sensitivity, 100% positive predictive value and 69.2% negative predictive value. The turnaround time including sample preparation and LAMP was circa 1 h. LAMP method may be used to detect the most frequent bacteria causing HAP. It is a simple, cheap, sensitive, specific and rapid assay.

Keywords: loop-mediated isothermal amplification (LAMP); hospital-acquired pneumonia (HAP); diagnostic techniques; respiratory system; critical care

1. Introduction

Hospital-acquired pneumonia (HAP) is the one that presents clinically two or more days after hospitalization and includes ventilator-associated pneumonia (VAP), which is defined as pneumonia that presents after 48 h with endotracheal intubation [1]. Patients with VAP present longer periods with mechanical ventilation, as well as longer stay in the ICU and in the hospital [2]. It is estimated that approximately 10%–40% of the patients undergoing mechanical ventilation for more than two days will develop VAP [2], with great differences among countries, type of patient, and type of intensive care unit (ICU). The implementation of different preventive strategies enabled a decrease in VAP cases, but it is still a very important problem among ventilated patients [3].

VAP is frequently caused by Gram-negative aerobic bacteria [4–6], such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter* spp; while *Staphylococcus aureus* is the most frequent Gram-positive pathogen [7]. In addition, the VAP can be polymicrobial, which complicates diagnosis and treatment. Regarding viruses, virus herpes simplex (HSV) [8] and cytomegalovirus (CMV) [9] can be reactivated in critical care patients and cause VAP. It should be noted that many of the pathogens causing VAP may present high levels of antibiotic resistance [2,7].

Unfortunately, the diagnosis of VAP is complicated and there is no reliable reference test [10]. The signs and symptoms of pneumonia, such as fever, tachycardia, leukocytosis and purulent secretions, are frequent in patients with mechanical ventilation and are not specific to VAP. Moreover, radiographic changes are difficult to interpret in this group of patients. Therefore, it is necessary to confirm the clinical suspicion of VAP through the microbiological culture of pulmonary secretions. However, the microbiological diagnosis also has several limitations: (1) difficulty to differentiate between colonization and infection; (2) non-homogeneous distribution of the infection in the lung; and (3) negative cultures due to previous empirical antibiotic treatment. Empirical treatment is usually initiated in patients with suspected VAP before having the definitive diagnosis [11], since early and adequate treatment decreases the mortality [12]. However, the indiscriminate administration of antibiotics exposes patients to unnecessary side effects, increases health care costs and favours the appearance of antibiotic resistance. Hence, the importance of knowing if there is an infection or not and the identification of the etiological agent [2].

The application of rapid diagnostic techniques to identify microbial pathogens seems to have a huge impact in the treatment of VAP, reducing inappropriate or unnecessary antimicrobial treatments and mortality in these patients [13,14]. Molecular biology techniques have allowed a faster diagnosis of VAP, especially in viral infections. They have the advantage of being faster than culture, allowing the detection of the causative agents even though the patient is receiving antibiotics and being able to quantify the bacterial concentration in the sample. On the other hand, in general they are relatively expensive techniques and detect a limited number of microorganisms.

The reaction based on the loop-mediated isothermal amplification (LAMP), developed in 2000 by Notomi et al. [15], is a rapid, simple, cheap and constant temperature nucleic acid amplification method. This method is very sensitive and specific, and there are numerous publications regarding its use in a wide range of applications [16]. LAMP is characterized by the use of 4 different primers to amplify 6 distinct regions on the target gene, an additional pair of primers to accelerate the reaction and a polymerase with high strand displacement activity in addition to a replication activity. LAMP has been used to identify respiratory pathogens, with promising results [17,18]. The purpose of this study was to develop and evaluate a rapid protocol to identify the main microorganisms involved in HAP by LAMP directly from respiratory samples.

2. Material and Methods

2.1. Study Design

We developed a rapid protocol to identify by LAMP six different bacteria (*P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *K. pneumoniae*, *Escherichia coli*, *S. aureus* and *Stenotrophomonas maltophilia*) and evaluated

its performance compared to culture. We used three different types of samples: bronchoalveolar lavage (BAL), endotracheal aspirate (EA) and bronchoaspirate (BAS). Two different protocols were optimized and used to deal with the different consistencies of the samples processed (aspirates being more difficult to work with due to sample thickness).

2.2. Collection of Samples

Positive and negative BAL, EA and BAS samples were collected from the Clinical Microbiology Laboratory at the Hospital Clinic of Barcelona (Spain), after being processed for routine techniques. The microbiological result was collected, including Gram stain and culture result. BAL collected during a two-year period (2016/17) and EA/BAS over six months (January to June 2018) were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. To standardize the protocol, negative samples were mixed to obtain a homogeneous matrix. Aliquots of this homogeneous negative sample was spiked with different microorganisms and used to determine the limits of detection for each microorganism.

2.3. Routine Microbiological Methods

Respiratory samples were collected in sterile containers and transported to the laboratory in less than two hours. Gram staining of the samples in the area of maximal purulence was examined for leukocytes and epithelial cells. Only respiratory samples with Murray–Washington classification degrees of IV (10–25 epithelial cells and >25 leukocytes per field using a low magnification lens ($\times 100$)), V (≤ 10 epithelial cells and >25 leukocytes) or VI (≤ 10 epithelial cells and ≤ 10 leukocytes) were processed for culture. Specimens not fulfilling these criteria were not considered to be representative of distal airways and were not processed for culture.

Good-quality respiratory specimens were quantitatively plated on blood and chocolate agar. Isolated bacteria were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Susceptibility testing was performed according to EUCAST guidelines (Available online: www.eucast.org). Potential pathogenic bacteria included *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, Gram-negative bacilli, *P. aeruginosa* and *S. aureus*. Non-potential pathogenic microorganisms included Viridans group streptococci, *Neisseria* spp, *Candida* spp, *Corynebacterium* spp, *H. parainfluenzae* and coagulase-negative staphylococci and were not considered as clinically significant. These samples were informed as having normal or mixed flora.

2.4. Extraction of DNA

Two protocols depending on the type of sample were performed, and they are described in Figure 1. Briefly, samples were concentrated by centrifugation and boiled in DireCtQuant 100W buffer (FrontexBioMed, Ltd./DireCtQuant, Lleida, Spain) to obtain extracted DNA. This extract was later on used for the LAMP test.

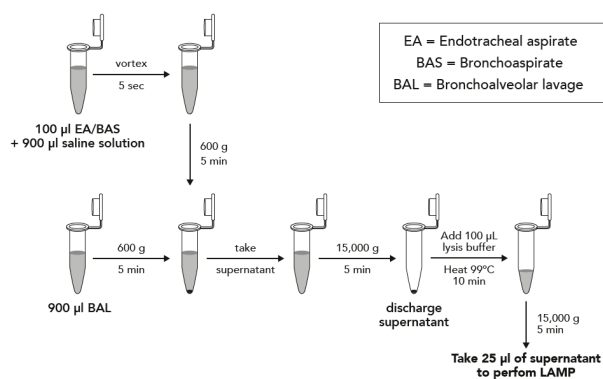


Figure 1. Sample preparation workflow for bronchoalveolar lavage (BAL) and bronchoaspirate/endotracheal aspirate (BAS/EA).

2.5. LAMP Protocol

Previously described primers [17] were used for *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. maltophilia*, and *S. aureus*. The LAMP was performed in 25 μ L of reaction mixture: 5 μ L primers (0.2 μ M outer, 1.6 μ M inner and 0.4 μ M loop primers), 15 μ L Isothermal Master Mix (Optigene) and 5.0 μ L of extraction product. Once the reaction mix is ready, gentle vortex and centrifugation must be performed. The reaction was conducted in a Versant kPCR (Siemens, Beersel, Belgium) at 65 °C for 40 min for BAL samples and in a Lightcycler®480 System (Roche, Sant Cugat del Vallès, Spain) at 65 °C for 30 min for EA/BAS. Both protocols can be implemented independently of the thermocycler, but we performed them in two different machines because they were done in different times and changes in laboratory equipment occurred.

2.6. Determination of the Limits of Detection

Each microorganism was inoculated into negative BAL samples to a final concentration ranging from 10^7 to 10^2 CFU/mL. For EA/BAS it was not possible to perform the same study for sensitivity due to the consistency of the samples and the physical impossibility of obtaining homogeneous matrix for all the dilutions. Instead, positive samples were used to perform serial 10-fold dilutions in saline buffer. Final concentration for each dilution was based on the approximate initial concentration determined by culture.

2.7. Statistical Analysis

Concordance between culture and LAMP results was studied. Major errors were defined as result discrepancies where the microorganism identified by LAMP was completely different from that identified in culture or the detection of a pathogen when the culture had none. Minor errors were defined as concordant results for the major pathogen identification, but LAMP identified additional microorganisms.

Diagnostic performance was based on sensitivity, specificity, negative- and positive-predictive values, and accuracy defined as described elsewhere [19,20]. Accuracy was calculated as concordant results over total number analyzed. Cohen's kappa coefficient was also calculated. Statistical analyses were performed using Stata version 15 (College Station, Texas, USA).

2.8. Ethical Aspects

The Ethical Committee of the Hospital Clinic of Barcelona, Spain, approved the study protocol on 9, August, 2016. The study is registered as HCB/2016/0294.

3. Results

3.1. BAL Samples

The limit of detection of LAMP for the different pathogens tested in BAL was 10^2 CFU/mL for *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*, and 10^4 CFU/mL for *S. maltophilia* and *A. baumannii*. No cross-reaction was identified using these primers while testing spiked samples with the other microorganisms included in the study. Regarding the evaluation with clinical samples, the concordance between culture and LAMP results is shown in Table 1. A total of 58 positive BAL samples were tested. All major errors happened due to a low concentration of bacterial in the sample, except for one case in which *A. baumannii* was not detected although with high concentration, and even after repeating the technique. The accuracy of the LAMP assay was of 77.6% or 87.9% if the minor errors were considered as a non-true or true result, respectively (Table 2). In addition, calculation of the clinical sensitivity and specificity yielded 100% (95%CI; 59% to 100%) specificity, a sensitivity of 86.3% (95%CI; 73.7% to 94.3%), a PPV of 100% and a NPV of 50% (95%CI; 33.5% to 66.6%) when minor errors were treated

as a true positive sample. The statistical data considering minor errors as a false positive sample are shown in Table 2.

Table 1. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) results from BAL samples according to the result obtained by culture.

Microorganisms Identified by Culture	N	Concordance	Minor Errors	Major Errors	Comments
<i>S. aureus</i>	19	15	2 ^{A,B}	2 ^{C,D}	^A LAMP: SAUR and SMAL detected ^B LAMP: SAUR and PAER detected (GNB in gram stain) ^{C,D} Culture: Few CFU of SAUR
<i>P. aeruginosa</i>	11	9	-	2 ^{E,F}	^E Culture: < 1000 CFU of PAER, LAMP: SAUR detected ^F Culture: <1000 CFU of PAER, LAMP negative
<i>S. maltophilia</i>	6	6	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	4	2	-	2 ^G	^G Culture: <1000 CFU of KPNE (two cases)
<i>E. coli</i>	3	3	-	-	-
<i>A. baumannii</i>	2	1	-	1 ^H	^H Culture: 100,000 CFU of ABAU
Negative	7	6	1 ^I	-	^I LAMP: KPNE detected (GNB in gram stain)
Mixed flora	6	3	3 ^{J,K,L}	-	^J LAMP:PAER detected ^K LAMP:SAUR detected ^L LAMP:KPNE detected
TOTAL	58	45	6	7	

N: number of samples tested by culture and LAMP; SAUR: *S. aureus*; SMAL: *S. maltophilia*; PAER: *P. aeruginosa*; KPNE: *K pneumoniae*; ECOL: *E. coli*; ABAU: *A. baumannii*; GNB: Gram-negative bacilli.

Table 2. Statistics of the use of LAMP to detect pathogens directly from BAL and BAS/EA samples.

	Minor Error as Wrong		Minor Error as Right	
	Value (%)	95%CI	Value (%)	95%CI
BAL				
Sensitivity	76.5	62.5–87.2	86.3	73.7–94.3
Specificity	85.7	42.1–99.6	100	59–100
PPV	97.5	86.3–99.6	100	89–100
NPV	33.3	21.9–47.2	50	33.5–66.6
Accuracy	77.6	64.7–87.5	87.9	76.7–95
Kappa coefficient	43.3	17.9–68.8	70.9	51.5–90.2
BAS/EA				
Sensitivity	68.9	57.1–79.2	94.6	86.7–98.5
Specificity	100	66.3–100	100	66.4–100
PPV	100	91.3–100	100	93.5–100
NPV	28.1	21.8–35.5	69.2	46.5–85.4
Accuracy	72.3	61.4–81.6	95.2	88.1–98.7
Kappa coefficient	46.3	29.2–63.5	89.7	80–99.5

BAL: bronchoalveolar lavage; BAS: bronchoaspirate; EA: endotraqueal aspirate; PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value; CI: confidence interval.

3.2. BAS/EA Samples

The estimated limit of detection of the LAMP assay to detect pathogens directly from BAS or EA samples was 10^2 CFU/mL for *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* and *A. baumannii*, 10^3 CFU/mL for *E. coli*, and 10^4 CFU/mL for *S. aureus* and *S. maltophilia*. No cross-reaction was identified using these primers while testing spiked samples with the other microorganisms included in the study. Regarding the

evaluation with clinical samples, a total of 83 samples were tested. The accuracy between culture and LAMP results is shown in Table 2 and it was of 95.2% or 72.3%, respectively when the minor errors were considered as true positives or not. In Table 3, the concordance between the LAMP assay and bacterial culture is shown. All major errors happened due to a low concentration of bacterial in the sample, except for two cases: *S. aureus* with more than 10,000 CFU/mL in culture and *A. baumannii* with 300,000 CFU/mL in culture.

Table 3. LAMP results from BAS/EA samples according to the result obtained by culture.

Microorganisms Identified by Culture	N	Concordance	Minor Errors	Major Errors	Comments
<i>K. pneumoniae</i>	13	10	3 ^{A,B}	-	^A LAMP: KPNE and ECOL detected (two cases) ^B LAMP: KPNE and PAER detected
<i>S. aureus</i>	10	7	2 ^{C,D}	1 ^E	^C LAMP: SAUR and KPNE detected ^D LAMP: SAUR and ECOL detected ^E Culture: <1000 CFU of SAUR
<i>P. aeruginosa</i>	11	9	2 ^F	-	^F LAMP: PAER and ECOL detected (two cases)
<i>E. coli</i>	8	3	5 ^{G,H,I,J}	-	^G LAMP: ECOL and PAER detected ^H LAMP: ECOL, PAER, SAUR and SMAL detected ^I LAMP: ECOL and KPNE detected ^J LAMP: ECOL, PAER and SMAL detected (two cases)
<i>S. maltophilia</i>	2	2	-	-	-
Polymicrobial	10	3	4	3	See Table S1 in Supplementary Material.
Other	10	7	3 ^{K,L,M}	-	^K LAMP: ECOL and KPNE detected ^L LAMP: PAER detected ^M LAMP: PAER, SAUR and SMAL detected
Mixed flora	10	10	-	-	-
Negative	9	9	-	-	-
TOTAL	83	60	19	4	

N: number of samples tested by culture and LAMP; KPNE: *K pneumoniae*; ECOL: *E. coli*; PAER: *P. aeruginosa*; SAUR: *S. aureus*; SMAL: *S. maltophilia*.

Regarding possible amplification inhibitors, a mix of lipidic, hematic, viscous and mucous samples were used and inoculated with the different microorganisms. No evidence of interference was observed in any of these prepared samples.

Most positive results appeared before 30 min, and together with the sample handling time, the results could be obtained within one-hour time.

The sensitivity, specificity, negative and positive predictive values of the LAMP assay to detect pathogens directly from BAS/EA samples are shown in Table 2. When minor errors were considered as false positive results, the sensitivity was 68.9% (95%CI; 57.1% to 79.2%), the specificity was 100% (95%CI; 66.4% to 100%), and the PPV and NPV were of 100% and 28.1%, respectively. However, when minor errors were considered as true positive the statistical indicators were: 94.6% (95%CI; 86.7% to 98.5%) sensitivity, 100% (95%CI; 66.4% to 100%) specificity, 100% PPV and 69.2% (95%CI; 46.5% to 85.4%) NPV (Table 2).

The time to positivity of the LAMP test was strongly correlated with the number of bacterial CFU/mL in culture in EA/BAS samples ($r = -0.71$, $p < 0.01$) but not in BAL samples (Figure 2). These results suggest that, at least in EA/BAS samples, the time to positivity of LAMP could be used as a semi-quantitative measure.

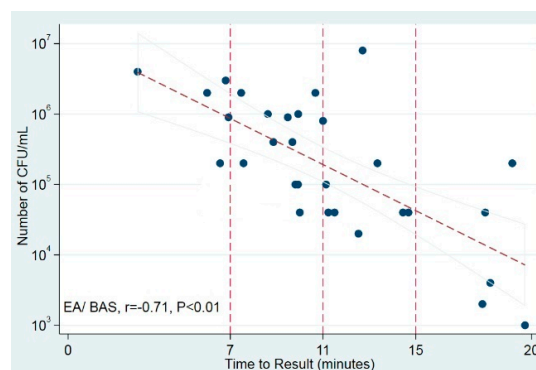


Figure 2. Correlation of time to positivity and bacterial load in culture. Scatter plot shows time to result (in minutes) against number of CFU/mL (log₁₀). Trend line displays best fit of all data points and the 95% CI for the prediction. Vertical reference lines indicate time points. BAS/EA: bronchoaspirate/endotracheal aspirate.

4. Discussion

Although new preventive measures have led to a reduction of HAP incidence, it remains associated with important morbi-mortality [21]. Therefore, it is necessary to introduce new methods to improve an early diagnosis. Here, we have evaluated the use of LAMP as a rapid diagnostic tool to identify the main pathogens involved in HAP with promising results.

In this study, we have performed a proof of concept of the use of LAMP to detect the main pathogens causing HAP directly from clinical respiratory samples. We found an overall accuracy between LAMP and culture of 88% for BAL samples and 95% for BAS/EA samples. Almost all syndromic tests available to identify pathogens causing respiratory tract infections include virus and atypical bacteria [22], but not many include the major bacterial pathogens causing HAP. Furthermore, rapid identification of the pathogen causing HAP is crucial to improve the patient outcome. In this sense, a multiplex PCR-based syndromic panel including 16 bacterial and one fungal target as well as 22 antimicrobial resistance markers has been evaluated [23–25], showing a sensitivity from 60% to 90% and a turnaround time of circa 4 h. In our case, as LAMP is much less affected than PCR by possible inhibitors in the sample [26], in the condition of high bacteria concentration, no automatic nucleic acid extraction is required, and therefore we can reduce turnaround including preparation of the sample and LAMP to around 1 h.

Kang et al. [17] performed a nationwide study in China in which the qLAMP assay was compared with culture to detect eight respiratory bacterial pathogens from sputum, detecting pathogens in 1047 (69.28%) patients from 1533 qualified patients. They used a kit for the nucleic acid extraction. In our study, although the number of samples included is limited, we have demonstrated that a LAMP applied to respiratory sample without a strict extraction step is possible.

Cost is also important. We have calculated that the LAMP assay (counting both reagents for nucleic acid extraction and LAMP together with plastic material) to detect the six pathogens causing HAP in this study will cost EUR 12.

LAMP may be useful then as a complementary tool to culture, allowing rapid identification of the microorganism causing the infection. In addition, a semi-quantitative approach can be used extrapolating the time to result with the CFU/mL in BAS and EA. In BAL, the data that we had were not sufficient to get a significant result (data not shown). If the quantification is under 10^2 – 10^3 CFU/mL, the LAMP will probably not provide a positive result, but in general the culture result will be considered as colonization in these cases. Therefore, every positive LAMP result should be taken into consideration, always taking into account the Gram stain, quality of samples and clinical situation of the patient. Culture should not be avoided in any case and LAMP could be implemented as a complement to accelerate the diagnosis of HAP.

Furthermore, it also seems promising for the detection of resistance genes [27,28]. Pathogen identification and potential antibiotic resistance is possible with LAMP, both more rapidly identified (1 h) than with a time consuming (16 to 24 h) classical phenotypic method. Furthermore, it could be even faster when applied directly to samples [29].

In conclusion, the LAMP method may be used to detect the most frequent bacteria causing HAP. It is a simple, cheap, sensitive, specific, and rapid (circa one hour) assay. Multiplexing targets may facilitate the implementation of this technique in routine laboratories. Each laboratory must adapt the targets according to its epidemiology.

Supplementary Materials: Supplementary Materials can be found at <http://www.mdpi.com/2076-2607/8/1/103/s1>. Table S1. LAMP results from polymicrobial BAS/EA samples according to the result obtained by culture.

Author Contributions: Conceptualization, A.V., Adrián Ceccato, J.P.d.l.B., P.C., A.T., F.M. and J.V.; Data curation, A.V.; Formal analysis, A.V., C.C.-P. and J.V.; Investigation, A.V., H.B. and A.C. (Adrián Ceccato); Methodology, A.V., H.B., M.L., A.C. (Adrià Cruells) and L.B.-F.; Supervision, A.V., J.V.; Validation, A.V., H.B., M.L. and J.M.-M.; Writing—original draft, A.V.; Writing—review & editing, A.V., H.B., A.C. (Adrián Ceccato), M.L., A.C. (Adrià Cruells), L.B.-F., J.M.-M., J.P.d.l.B., P.C., A.T., F.M., C.C.-P. and J.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by Ajut a la Recerca “Clínic-La Pedrera” 2016 (PEP:HB-16-JF-VG-C) and from the Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD16/0016/0010) and was co-financed by European Development Regional Fund “A way to achieve Europe”. This work was also supported by award 2017 SGR 0809 from the Agència de Gestió d’Ajuts Universitaris i de Recerca of the Generalitat de Catalunya.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kohbodi, G.N.A.; Noor, A. Pneumonia, Ventilator-Associated. [Updated 2018 November 18]. In *StatPearls [Internet]*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, January 2019. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507711/> (accessed on 14 January 2019).
2. Li Bassi, G.; Ferrer, M.; Marti, J.D.; Comaru, T.; Torres, A. Ventilator-Associated Pneumonia. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **2014**, *35*, 469–481.
3. Torres, A.; Niederman, M.S.; Chastre, J.; Ewig, S.; Fernandez-Vandellos, P.; Hanberger, H.; Marin, K.; Li Bassi, G.; Luna, C.M.; Martin-Loeches, I.; et al. International ERS/ESICM/ESCMID/ALAT guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: Guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia (HAP)/ventilator-associated pneumonia (VAP) of the European Respiratory Society (ERS), European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and Asociación Latinoamericana del Tórax (ALAT). *Eur. Respir. J.* **2017**, *50*, 1700582. [[PubMed](#)]
4. Aykac, K.; Ozsurekci, Y.; Basaranoglu, S.T. Future Directions and Molecular Basis of Ventilator Associated Pneumonia. *Can. Respir. J.* **2017**, *2017*, 2614602. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Chi, S.Y.; Kim, T.O.; Park, C.W.; Yu, J.Y.; Lee, B.; Lee, H.S.; Kim, Y.I.I.; Lim, S.C.; Kwon, Y.S. Bacterial pathogens of ventilator associated pneumonia in a tertiary referral hospital. *Tuberc. Respir. Dis.* **2012**, *73*, 32–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Injac, V.; Batranovic, U.; Matijasevic, J.; Vukoja, M.; Hadnadjev, M.; Bukumiric, Z.; Trajkovic, G.; Jankovic, S. Etiology and resistance patterns of bacteria causing ventilator-associated pneumonia in a respiratory intensive care unit. *Vojn. Pregl.* **2017**, *74*, 954–962. [[CrossRef](#)]
7. Ferrer, M.; Difrancesco, L.F.; Liapikou, A.; Rinaudo, M.; Carbonara, M.; Li Bassi, G.; Gabarrus, A.; Torres, A. Polymicrobial intensive care unit-acquired pneumonia: Prevalence, microbiology and outcome. *Crit. Care* **2015**, *19*, 450. [[CrossRef](#)]

8. Bouza, E.; Giannella, M.; Torres, M.V.; Catalán, P.; Sánchez-Carrillo, C.; Hernandez, R.I.; Muñoz, P.; Marañón, G. Task Force for Pneumonia. Herpes simplex virus: A marker of severity in bacterial ventilator-associated pneumonia. *J. Crit. Care* **2011**, *26*, 432.e1–432.e6. [[CrossRef](#)]
9. Osman, N.M.; Sayed, N.M.; Abdel-Rahman, S.M.; Hamza, S.A.; Abd al Aziz, A.A. The impact of cytomegalovirus infection on mechanically ventilated patients in the respiratory and geriatric intensive care units. *Egypt J. Chest Dis. Tuberc.* **2014**, *63*, 239–245. [[CrossRef](#)]
10. Klompas, M. Does this patient have ventilator-associated pneumonia? *JAMA* **2007**, *297*, 1583–1593. [[CrossRef](#)]
11. Kalanuria, A.A.; Zai, W.; Mirski, M. Ventilator-associated pneumonia in the ICU. *Crit. Care* **2014**, *18*, 208. [[CrossRef](#)]
12. Herkel, T.; Uvizl, R.; Doubravska, L.; Adamus, M.; Gabrhelik, T.; Htoutou Sedlakova, M.; Kolarc, M.; Hanulick, V.; Pudovac, V.; Langovad, K.; et al. Epidemiology of hospital-acquired pneumonia: Results of a Central European multicenter, prospective, observational study compared with data from the European region. *Biomed. Pap.* **2016**, *160*, 448–455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Roberts, K.L.; Micek, S.T.; Juang, P.; Kollef, M.H. Controversies and advances in the management of ventilator associated pneumonia. *Expert Rev. Respir. Med.* **2017**, *11*, 875–884. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Millot, G.; Voisin, B.; Loiez, C.; Wallet, F.; Nseir, S. The next generation of rapid point-of-care testing identification tools for ventilator-associated pneumonia. *Ann. Transl. Med.* **2017**, *5*, 451. [[CrossRef](#)]
15. Notomi, T.; Okayama, H.; Masubuchi, H.; Yonekawa, T.; Watanabe, K.; Amino, N.; Hase, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, E63. [[CrossRef](#)]
16. Dhama, K.; Karthik, K.; Chakrabort, S.; Tiwari, R.; Kapoor, S.; Kumar, A.; Thomas, P. Loop-mediated Isothermal Amplification of DNA (LAMP): A New Diagnostic Tool Lights the World of Diagnosis of Animal and Human Pathogens: A Review. *Pak. J. Biol. Sci.* **2014**, *17*, 151–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Kang, Y.; Deng, R.; Wang, C.; Deng, T.; Peng, P.; Cheng, X.; Wang, G.; Qian, M.; Gao, H.; Han, B.; et al. Etiologic Diagnosis of Lower Respiratory Tract Bacterial Infections Using Sputum Samples and Quantitative Loop-Mediated Isothermal Amplification. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e38743. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Petrone, B.L.; Wolff, B.J.; DeLaney, A.A.; Diaz, M.H.; Winchell, J.M. Isothermal Detection of *Mycoplasma pneumoniae* Directly from Respiratory Clinical Specimens. *J. Clin. Microbiol.* **2015**, *53*, 2970–2976. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Altman, D.G.; Bland, J.M. Diagnostic tests. 1: Sensitivity and specificity. *BMJ* **1994**, *308*, 1552. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Altman, D.G.; Bland, J.M. Diagnostic tests 2: Predictive values. *BMJ* **1994**, *309*, 102. [[CrossRef](#)]
21. Li Bassi, G.; Senussi, T.; Aguilera, E. Prevention of ventilator-associated pneumonia. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2017**, *30*, 214–220. [[CrossRef](#)]
22. Torres, A.; Lee, N.; Cilloniz, C.; Vila, J.; Van der Eerden, M. Laboratory diagnosis of pneumonia in the molecular age. *Eur. Respir. J.* **2016**, *48*, 1764–1778. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Jamal, W.; Al Roomi, E.; AbdulAziz, L.R.; Rotimi, V.O. Evaluation of Curetis Unyvero, a Multiplex PCR-Based Testing System, for Rapid Detection of Bacteria and Antibiotic Resistance and Impact of the Assay on Management of Severe Nosocomial Pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, 2487–2492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Kunze, N.; Moerer, O.; Steinmetz, N.; Schulze, M.H.; Quintel, M.; Perl, T. Point-of-care multiplex PCR promises short turnaround times for microbial testing in hospital-acquired pneumonia—An observational pilot study in critical ill patients. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **2015**, *14*, 33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Ozongwu, C.; Personne, Y.; Platt, G.; Jeanes, C.; Aydin, S.; Kozato, N.; Gant, V.; O’Grady, J.; Enne, V.I. The Unyvero P55 ‘sample-in, answer-out’ pneumonia assay: A performance evaluation. *Biomol. Detect. Quantif.* **2017**, *13*, 1–6. [[CrossRef](#)]
26. Kaneko, H.; Kawana, T.; Fukushima, E.; Suzutani, T. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2007**, *70*, 499–501. [[CrossRef](#)]
27. Vergara, A.; Zboromyrska, Y.; Mosqueda, N.; Morosini, M.I.; García-Fernández, S.; Roca, I.; Cantón, R.; Marco, F.; Vila, J. Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification-Based Methodology to Detect Carbapenemase Carriage in *Acinetobacter* Clinical Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 7538–7540. [[CrossRef](#)]

28. Garcia-Fernandez, S.; Morosini, M.I.; Marco, F.; Gijón, D.; Vergara, A.; Vila, J.; Ruiz-Carbajosa, P.; Cantón, R. Evaluation of the eazyplex(R) SuperBug CRE system for rapid detection of carbapenemases and ESBLs in clinical *Enterobacteriaceae* isolates recovered at two Spanish hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* **2015**, *70*, 1047–1050. [[CrossRef](#)]
29. Zboromyrska, Y.; Vergara, A.; Cosgaya, C.; Verger, G.; Mosqueda, N.; Almela, M.; Pitart, C.; Roca, I.; Marco, F.; Vila, J. Rapid detection of β -lactamases directly from positive blood cultures using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based assay. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2015**, *46*, 355–356. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplementary table. LAMP results from polymicrobial BAS/EA samples according to the result obtained by culture.

Type of error	Culture	LAMP
Major	<1000 ufc of <i>S. aureus</i> <1000 ufc of <i>P. aeruginosa</i>	Negative
Major	>10000 ufc of <i>S. aureus</i> 2000000 ufc of <i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i> not detected <i>P. aeruginosa</i> and <i>E. coli</i> detected
Major	300000 ufc of <i>A. baumannii</i> 300000 ufc of <i>E. coli</i>	<i>A. baumannii</i> not detected <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> and <i>S. maltophilia</i> detected
Minor	40000 ufc of <i>P. aeruginosa</i> 100000 ufc of <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> and <i>S. maltophilia</i> detected
Minor	500000 ufc of <i>S. aureus</i> 3000000 ufc of <i>A. baumannii</i>	<i>S. aureus</i> , <i>A. baumannii</i> and <i>K. pneumoniae</i> detected
Minor	900000 ufc of <i>P. aeruginosa</i> 80000 ufc of <i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> and <i>S. maltophilia</i> detected
Minor	1000 ufc of <i>S. aureus</i> 60000 ufc of <i>S. maltophilia</i>	<i>S. aureus</i> , <i>S. maltophilia</i> and <i>E. coli</i> detected

Artículo 2.

Vergara A, Vendrell R, Alejo-Cancho I, Rodríguez C, Vila J, Marcos MA. Rapid detection of herpes simplex virus-1 from bronchoalveolar lavage fluids using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Enferm Infecc Microb Clin* 2019; 37 (5): 353-354.

Hipótesis

En pacientes críticos, el VHS puede causar enfermedad pulmonar potencialmente mortal. El cultivo celular es el método de referencia para su diagnóstico, pero se necesitan de dos a tres días para detectar el efecto citopático. Nuevas tecnologías, especialmente la PCR, permiten una detección del virus más rápida, aunque más costosa. La LAMP puede ser un método válido y más económico para la detección de VHS en muestras respiratorias.

Objetivos

Evaluar la eficacia de una LAMP y compararla con el cultivo convencional para detectar VHS-1 en muestras de LBA.

Material y métodos

Se incluyeron un total de 50 muestras de LBA de pacientes con sospecha de infección respiratoria. La LAMP se diseñó empleando seis *primers* descritos previamente, dirigidos frente al gen de la glicoproteína G del VHS-1. La LAMP se realizó utilizando la “Isothermal Master Mix” de Optigene y la detección, mediante fluorescencia en tiempo real. Para cada muestra se realizaron tres reacciones de LAMP: directamente de la muestra, después de hervir 50 µL de muestra durante 10 minutos, y después de la extracción automática del ADN. Los resultados se compararon con el cultivo y una PCR a tiempo real comercial.

Resultados

Resultados

El cultivo detectó 27 muestras positivas y 23 muestras negativas, mientras que la LAMP detectó VHS-1 en 23 muestras en las que se había extraído el ADN, y en 21 muestras en las que se realizó la LAMP después de hervir la muestra o directamente sobre la misma. No hubo reacciones cruzadas con otros herpesvirus. Excluyendo dos muestras con resultados negativos para la PCR y LAMP, la concordancia entre cultivo y LAMP fue del 92,0% (44/48, coeficiente kappa de 0,834) para la LAMP después de extraer el ADN y 88,0% (42/48, coeficiente kappa de 0,751) para la LAMP después de hervir o directamente realizada sobre la muestra. La sensibilidad de la LAMP fue del 88,0% (22/25) después de la extracción de ADN y 80,0% (20/25) cuando se realizó después de hervir o directamente sobre la muestra. El tiempo medio de positividad fue de 75,7 minutos cuando se realizó la extracción de ADN (60 min para la extracción más 15,7 min para LAMP); de 30,6 min para la LAMP después de hervir (10 min para hervir más 20,6 min para LAMP); y de 22,8 min para la LAMP realizada directamente sobre la muestra; frente a 3-5 días del cultivo celular.

Conclusiones

Los resultados de este estudio muestran que el ensayo LAMP se puede utilizar como una herramienta de cribado rápido para detectar VHS-1 en LBA de pacientes críticos.

Rapid detection of herpes simplex virus-1 from bronchoalveolar lavage fluids using loop-mediated isothermal amplification (LAMP)



Detección rápida del virus herpes simple-1 en lavado broncoalveolar mediante loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Herpes simplex virus (HSV) is a wide spread pathogen with symptoms during infection ranging from completely asymptomatic to a combination of mild symptoms.¹ In critically ill patients HSV can cause life-threatening pulmonary disease.² Cell culture is the gold standard for the diagnosis of HSV, but 2–3 days are needed to detect the cytopathic effect.¹ New technologies, especially polymerase chain reaction (PCR) allows more rapid, albeit more costly, detection of the virus.³ Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)⁴ has shown to be comparable with culture and PCR for the detection of HSV in genital lesions.⁵ The aim of this study was to evaluate the efficacy of LAMP compared to conventional culture to detect HSV-1 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF).

A total of 50 BALF samples were included from patients with clinically suspected respiratory infection. The samples were routinely cultured in human fibroblast cells and monitored for up to 3 weeks to determine the presence of HSV by cytopathic effect observation and immunofluorescent detection of the antigen using monoclonal antibodies (MicroTrak[®] HSV1/HSV2 Direct Specimen Identification/Typing Test Kit, TrinityBiotech, Ireland).

A set of six previously described primers against the gene encoding the HSV-1 glycoprotein G (gG) were used,⁶ comprising two outer, two inner and two loop primers. The LAMP reaction was performed with 25 μ L of the reaction mixture: 2.5 μ L mix of primers (final concentration 0.2 μ M for outer primers, 1.6 μ M for inner primers and 0.4 μ M for loop primers), 15 μ L Isothermal Master Mix (Optigene, United Kingdom), 2.5 μ L PCR grade water and 5.0 μ L DNA/sample. The reaction was conducted in a Versant kPCR System (Siemens) at 65 °C for 40 minutes and the LAMP product detected by real time fluorescence. For each sample three reactions were performed: directly from the sample, after boiling 50 μ L of sample for 10 minutes and after automatically extracting the DNA using the DSP Virus/Pathogen Midi kit (Qiagen, Germany) in a QIASymphony automated platform (Qiagen, Germany). The specificity of the LAMP assay was evaluated using extracted DNA from 3 positive samples of HSV-2, varicella zoster virus (VZV), Epstein-Bar virus (EBV), cytomegalovirus (CMV) and herpesvirus 6 (HV6). Molecular detection of HSV-1 was performed by real-time quantitative PCR (rtPCR) (HSV1 Q-PCR Alert AmpliMIX, ELITechGroup NANOGEN[®], Italy) with extracted DNA in case of discrepancies between culture and LAMP.

Culture detected 27 positive and 23 samples were negative, whereas LAMP detected HSV-1 in 23 samples in which DNA was extracted and in 21 samples in which LAMP was performed after boiling or directly with the sample. LAMP products were not detected with the DNAs of HSV-2, VZV, EBV, CMV and HV6. After DNA extraction, LAMP only failed to detect HSV-1 in five cases in which rtPCR was also negative (two cases) or presented late threshold cycles (three cases). In one case with negative culture, all variants of LAMP and rtPCR were positive.

Excluding the two samples with negative results for rtPCR and LAMP, the concordance observed between culture and LAMP was 92.0% (44/48, kappa coefficient of 0.834) for LAMP after extracting the DNA and 88.0% (42/48), kappa coefficient of 0.751) for LAMP after boiling or directly with the sample. The sensitivity of LAMP was 88.0% (22/25) after DNA extraction and 80.0% (20/25) when performed after boiling or using directly the sample (Table 1).

The average time to achieve a positive result was 75.7 minutes after DNA extraction (60 min for extraction plus 15.7 min for LAMP),

Table 1

Sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of LAMP (using DNA obtained by extraction or performed after boiling or directly with the sample) for HSV-1 detection from bronchoalveolar samples.

	LAMP		
	Extract	Boiling	Direct
Sensitivity (% CI95%)	88.0 (67.7–96.8)	80.0 (58.7–92.4)	80.0 (58.7–92.4)
Specificity (% CI95%)	95.7 (76.0–99.8)	95.7 (76.0–99.8)	95.7 (76.0–99.8)
PPV (% CI95%)	95.7 (76.0–99.8)	95.2 (74.1–99.8)	95.2 (74.1–99.8)
NPV (% CI95%)	88.0 (67.7–96.8)	81.5 (61.3–93.0)	81.5 (61.3–93.0)

LAMP: loop-mediated isothermal amplification; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; CI95%: 95% confidence interval.

30.6 min for LAMP after boiling (10 min for boiling plus 20.6 min for LAMP), and 22.8 min for LAMP performed directly with the sample versus three to five days for virus culture.

LAMP assays are emerging as a good and inexpensive alternative for the diagnosis of HSV-1 infections. Previous studies have evaluated LAMP to detect HSV-1 in vitreous,⁷ cutaneous^{5,8} and cerebrospinal fluid samples,⁹ but this is the first study to evaluate the use of a LAMP in respiratory samples. Our results showed very good concordance between culture and LAMP. Performing LAMP directly from the sample saved time and showed similar results compared to LAMP performed in extracted DNA. Discordances with positive culture and negative rtPCR might be explained by the freeze and thaw cycles (DNA was probably degraded). On the other hand, the case with negative culture and positive LAMP and rtPCR could be explained by the virus not being viable. This is not the first time that the results of LAMP performed with and without DNA extraction have shown similar results.⁸ By avoiding the extraction step, LAMP can be performed in short time and is less expensive. The presence of HSV-1 in BALF is related to patient outcomes,¹⁰ including increased mortality. However, few laboratories include the detection of HSV-1 in respiratory samples from critically ill patients thereby leading to possible misdiagnosis of infection. One of the limitations of this study is the lack of analytical sensitivity, but the main objective is to detect those patients with higher viral loads and worse potential outcome. The results of this study show that the LAMP assay can be used as a rapid screening tool to detect HSV-1 in BALF from these patients.

Fundings

This work was supported by Ajut a la Recerca “Clínic-La Pedrera” 2016 (PEP:HB-16-JF-VG-C) and grant 2014SGR0653 from the Departament de Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya, by the Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III, co-financed by European Regional Development Fund (ERDF) “A Way to Achieve Europe,” the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD16/0016/0010).

References

- Rechenchoski DZ, Faccin-Galhardi LC, Linhares REC, Nozawa C. Herpesvirus: an underestimated virus. *Folia Microbiol (Praha)*. 2017;62:151–6. <http://dx.doi.org/10.1007/s12223-016-0482-7>.
- Bruynseels P, Jorens PG, Demey HE, Goossens H, Pattyn SR, Elseviers MM, et al. Herpes simplex virus in the respiratory tract of critical care patients: a prospective study. *Lancet*. 2003;362:1536–41. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14740-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14740-X).
- Vila J, Zboromyrska Y, Vergara A, Alejo I, Rubio E, Álvarez-Martínez MJ, et al. Molecular diagnostic methods of respiratory infections. Has the scheme diagnosis changed? *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016;34:40–6. [http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X\(16\)30218-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X(16)30218-X).

4. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:E63.
5. Sugiyama H, Yoshikawa T, Ihira M, Enomoto Y, Kawana T, Asano Y. Comparison of loop-mediated isothermal amplification, real-time PCR, and virus isolation for the detection of herpes simplex virus in genital lesions. *J Med Virol.* 2005;75:583–7, <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.20309>.
6. Enomoto Y, Yoshikawa T, Ihira M, Akimoto S, Miyake F, Usui C, et al. Rapid diagnosis of herpes simplex virus infection by a loop-mediated isothermal amplification method. *J Clin Microbiol.* 2005;43:951–5, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.2.951-955.2005>.
7. Reddy AK, Balne PK, Reddy RK, Mathai A, Kaur I. Loop-mediated isothermal amplification assay for the diagnosis of retinitis caused by herpes simplex virus-1. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:210–3, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03216.x>.
8. Kobayashi T, Yagami A, Suzuki K, Ihira M, Yoshikawa T, Matsunaga K. Clinical utility of loop-mediated isothermal amplification assay for the diagnosis of common alpha herpesvirus skin infections. *J Dermatol.* 2013;40:1033–7, <http://dx.doi.org/10.1111/1346-8138.12325>.
9. Kimura H, Ihira M, Enomoto Y, Kawada J, Ito Y, Morishima T, et al. Rapid detection of herpes simplex virus DNA in cerebrospinal fluid: comparison between loop-mediated isothermal amplification and real-time PCR. *Med Microbiol Immunol.* 2005;194:181–5, <http://dx.doi.org/10.1007/s00430-005-0242-9>.
10. Linssen CFM, Jacobs JA, Stelma FF, van Mook WNKA, Terporten P, Vink C, et al. Herpes simplex virus load in bronchoalveolar lavage fluid is related to poor outcome in critically ill patients. *Intensive Care Med.* 2008;34:2202–9, <http://dx.doi.org/10.1007/s00134-008-1231-4>.

Andrea Vergara ^{a,b,*}, Roser Vendrell ^a, Izaskun Alejo-Cancho ^a,
Cristina Rodríguez ^a, Jordi Vila ^{a,b}, M^a Angeles Marcos ^{a,b}

^a *Department of Clinical Microbiology, CDB, Hospital Clínic of Barcelona, Barcelona, Spain*

^b *ISGlobal, Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB) – Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain*

* Corresponding author.

E-mail address: VERGARA@clinic.cat (A. Vergara).

2529-993X/

© 2018 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Artículo 3.

Vergara A*, Cilloniz C*, Luque N, García-Vidal C, Tejero J, Perelló R, Lucena CM, Torres A, Marcos MA. Detection of human cytomegalovirus in bronchoalveolar lavage of intensive care unit patients. Eur Respir J 2018; 51: 1701332. *Coautoras

Hipótesis

La enfermedad causada por CMV varía desde un estado asintomático hasta un síndrome similar a la mononucleosis y enfermedades como neumonía, retinitis o infección gastrointestinal. La enfermedad más grave ocurre en la infección congénita y en pacientes inmunodeprimidos, en quienes el virus actúa como oportunista. Sin embargo, el papel del CMV en otras poblaciones está menos claro y es controvertido. Algunos estudios en pacientes críticos describen una relación entre CMV y mayores tasas de mortalidad, duración más prolongada de la estancia hospitalaria y más necesidad de ventilación mecánica.

Objetivos

Evaluar la incidencia, características clínicas, factores de riesgo y evolución de pacientes en la UCI con CMV detectado en LBA.

Material y métodos

Estudio prospectivo observacional en el que se incluyeron pacientes ingresados en UCI a los que se había tomado muestra de LBA. Se recogieron datos demográficos, comorbilidades, estado de inmunosupresión, antibióticos en los 30 días previos al ingreso hospitalario,

Resultados

tratamiento con corticosteroides, síntomas clínicos, parámetros de laboratorio, procedimientos de diagnóstico, soporte ventilatorio, duración de la estancia hospitalaria, duración de la estancia en UCI y mortalidad a los 30 días. El LBA se cultivó y analizó para la detección de bacterias, hongos, virus y parásitos. En el caso de CMV se realizó cultivo celular, así como PCR en LBA y plasma.

Resultados

Se incluyeron 133 pacientes, de los cuales 35/133 (26%) presentaron CMV, siendo en 18/133 (14%) casos el único microorganismo detectado. Los pacientes con CMV tenían más probabilidades de haber recibido previamente corticosteroides sistémicos (49% *versus* 21%, $p = 0,002$), estaban inmunosuprimidos con mayor frecuencia (71% *versus* 48%, $p = 0,017$), tenían estancias hospitalarias más prolongadas (46 días *versus* 35 días, $p = 0,017$), y tuvieron tasas de mortalidad más altas a los 30 días (64% *versus* 41%, $p = 0,024$). El análisis de regresión logística multivariante reveló que el uso previo de corticosteroides (OR 3,46; IC 95%: 1,53-7,86) fue el único factor de riesgo para la detección positiva de CMV.

Conclusiones

La morbi-mortalidad asociada a esta infección sugiere que el cribado de CMV sería necesario en los pacientes de UCI con sospecha de infección respiratoria.



Detection of human cytomegalovirus in bronchoalveolar lavage of intensive care unit patients

To the Editor:

The seroprevalence of human cytomegalovirus (CMV) is very high worldwide [1, 2] and the spectrum of disease caused by it ranges from an asymptomatic state to a mononucleosis-like syndrome to severe diseases such as pneumonia, retinitis or gastrointestinal infection. The most severe disease occurs in congenital infection and in immunosuppressed patients, in whom the virus acts as an opportunistic pathogen. However, the role of CMV in other populations is less clear and is controversial [3]. Some studies in critical patients describe a relationship between CMV and increased mortality rates, longer length of stay and prolonged need for mechanical ventilation [3–5]. The incidence of active CMV infection depends on the diagnostic method used. Several epidemiological studies and systematic reviews have assessed the incidence of CMV infection in mechanically ventilated, critically ill patients, finding values ranging from 0–36% [5–7]. In this study, we aimed to assess the incidence, clinical characteristics, risk factors and outcomes for intensive care unit (ICU) patients with CMV detection by bronchoalveolar lavage (BAL).

We performed a prospective observational cohort study of consecutive adult patients admitted to two ICUs within 24 h of admission to the Emergency Department. This study was conducted at the Hospital Clínic of Barcelona (Barcelona, Spain) between January 2013 and November 2015 and the inclusion criteria were: 1) patients must be admitted to the ICU, and 2) appropriate practice of BAL (BAL samples were collected when respiratory infection was suspected and in the presence of bilateral pulmonary infiltrates; range of sampling: 0–8 h after suspicion). The decision of whether to perform bronchoscopy with BAL was made by the attending physicians. In some cases physicians also ordered PCR in plasma but this test was not performed in all patients. Due to the nature of the study, the researchers had no impact on this decision.

The following parameters were recorded: demographics, comorbidities, immunosuppression status, antibiotic treatment in the previous 30 days before hospital admission, treatment with oral and inhaled corticosteroids, clinical symptoms, laboratory parameters, diagnostic procedures, ventilatory support, length of hospital stay, length of ICU stay and 30-day mortality. Immunosuppression was defined as the presence of solid organ or bone marrow transplantation, HIV infection, cancer under chemotherapy and/or treatment with corticosteroids (daily doses >20 mg prednisolone-equivalent for more than 2 weeks in the month prior to admission). The sepsis-related organ failure assessment (SOFA) score was calculated at ICU admission [8]. Samples (BAL and plasma) were collected when respiratory infection was suspected (*i.e.* observation of new pulmonary infiltrates; range of sampling 0–8 h after suspicion). The results of BAL were cultured for bacteria, fungi and mycobacteria and 100 µL of BAL material were inoculated onto sheep's blood, chocolate, blood charcoal yeast extract (BCYE) and Sabouraud agar. All cultures were incubated at 37 °C under aerobic conditions and in a carbon dioxide enriched atmosphere (except for Sabouraud agar that was incubated at 25 °C). Cultures were evaluated for growth at 24 h and 48 h and discarded if results were negative. Bacterial identification and antibiotic susceptibility tests were performed according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) guidelines and breakpoints (version 5.0, 2015; www.eucast.org). *Pneumocystis jirovecii* was detected by methenamine silver stain while human fibroblast cells were used for the detection of herpes simplex viruses 1 and 2 (HSV-1 and HSV-2) from BAL (monitored for up to 1 week for signs of infection). A BAL was considered positive when a cytopathic effect was observed on conventional cell cultures and then confirmed by

 @ERSpublications

What is the role of cytomegalovirus (CMV) in ICU patients? <http://ow.ly/GeM130holtF>

Cite this article as: Vergara A, Cilloniz C, Luque N, *et al.* Detection of human cytomegalovirus in bronchoalveolar lavage of intensive care unit patients. *Eur Respir J* 2018; 51: 1701332 [<https://doi.org/10.1183/13993003.01332-2017>].

immunofluorescence detection of the antigen. Molecular detection of CMV in BAL and plasma was performed by real-time quantitative PCR (ELITechGroup S.p.A., Milan, Italy) after extraction of DNA with a DSP Virus/Pathogen Midi Kit on a QIASymphony automated platform (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). This technique has a detection limit of 20 copies·mL⁻¹ and a quantitative limit of 282 copies·mL⁻¹. Other respiratory viruses were detected by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays as previously described [9].

For categorical variables we report the number and percentage of patients while for continuous variables we report the median (interquartile range (IQR)). Categorical variables were compared using the Chi-squared or Fisher exact tests. Continuous variables were compared using the Mann–Whitney test. Logistic regression analyses were performed to identify variables associated with positive detection of CMV and variables that showed a p-value <0.20 in the univariate analyses were included in the multivariate model (a backward stepwise procedure). The Hosmer–Lemeshow goodness-of-fit test was performed to assess the overall fit of the multivariate model [10]. The area under the receiver operating characteristic (ROC) curve of the multivariate model to predict positive detection of CMV was calculated. Internal

TABLE 1 Baseline characteristics, conditions and clinical outcomes, and their associated cytomegalovirus (CMV) PCR results in bronchoalveolar lavage

Variable	Negative CMV (n=98)	Positive CMV (n=35)	p-value
Demographic			
Age years (median (IQR))	62.0 (23.0)	61.0 (24.0)	0.37
Men	63 (64)	23 (66)	0.88
Current smoker	31 (36)	7 (25)	0.28
Current alcohol consumer	8 (10)	2 (7)	>0.99
Immunocompromised[#]	47 (48)	25 (71)	0.017
HIV	8 (8)	3 (9)	>0.99
Transplant	19 (19)	9 (26)	0.43
Cancer	16 (16)	7 (20)	0.62
Systemic corticosteroids [¶]	21 (21)	17 (49)	0.002
Diagnosis at ICU admission			0.73
Respiratory failure	59 (60)	24 (69)	
Septic shock	18 (18)	5 (14)	
Cardiac failure	9 (9)	2 (6)	
Sepsis	5 (5)	1 (3)	
Other	7 (7)	3 (9)	
Previous antibiotic	7 (7)	3 (9)	0.72
Comorbidities[*]	76 (78)	26 (74)	0.70
Chronic respiratory disease	27 (28)	8 (23)	0.55
Chronic cardiovascular disease	23 (24)	6 (17)	0.44
Diabetes mellitus	12 (12)	6 (17)	0.57
Neurological disease	11 (11)	7 (20)	0.25
Chronic renal disease	12 (12)	7 (20)	0.27
Chronic liver disease	4 (4)	2 (6)	0.65
Arterial hypertension	38 (39)	18 (51)	0.19
Laboratory tests (median (IQR))			
Creatinine mg·mL ⁻¹	1.0 (1.0)	1.2 (1.1)	0.98
C-reactive protein mg·dL ⁻¹	12.5 (15.9)	11.9 (20.0)	0.87
White blood-cell count 10 ⁹ ·L ⁻¹	10.0 (9.0)	9.0 (12.0)	0.41
SOFA score at ICU admission (median (IQR))	5 (6)	5 (5)	0.91
Outcomes			
Pulmonary complications	16 (39)	5 (33)	0.70
NIMV	59 (94)	17 (94)	>0.99
IMV	72 (92)	26 (93)	>0.99
Hospital stay days (median (IQR))	35.0 (33.0)	46.0 (62.0)	0.017
ICU stay days (median (IQR))	19.5 (21.5)	31.5 (69.0)	0.070
30-day mortality	38 (41)	21 (64)	0.024

Data are presented as n (%) unless otherwise stated. Values in bold are for when p<0.05. IQR: interquartile range; ICU: intensive care unit; SOFA: sepsis-related organ failure assessment; NIMV: noninvasive mechanical ventilation; IMV: invasive mechanical ventilation. [#]: subjects may have more than one immunocompromising condition; [¶]: daily doses >20 mg prednisolone-equivalent for more than 2 weeks in the month previous to admission; ^{*}: subjects may have more than one comorbid condition.

validation was conducted using ordinary nonparametric bootstrapping with 1000 bootstrap samples and bias-corrected, accelerated 95% confidence intervals (CIs) [11]. The level of significance was set at 0.05 (2-tailed). All analyses were performed using IBM SPSS Statistics 22.0 (Armonk, New York, USA).

During the study period 880 patients were admitted to the two ICUs. BAL was performed in 133 patients (15%). The three main causes of ICU admission in these 133 patients were: respiratory failure (n=83, 62%), septic shock (n=23, 17%) and cardiac failure (n=11, 8%). The main cause for BAL administration was suspected respiratory infection. Detection of CMV was positive in 35 out of 133 BAL samples (26%) with a median copies-mL⁻¹ value of 7637 (IQR 2604–47249). Testing for CMV was also performed in 19 plasma samples obtained from patients with CMV in BAL testing and results were positive in 13 out of 19 cases (68%) with a median copies-mL⁻¹ value of 4323 (IQR 433–2272).

In 18 out of 133 BAL procedures (14%) CMV was the only microorganism detected, while in 17 out of 133 procedures (13%) CMV and other microorganisms were detected. In 49 out of 133 procedures (37%) only microorganisms different from CMV were detected and in 49 out of 133 procedures (37%) no microorganisms were detected. *Pseudomonas aeruginosa* was the most frequent microorganism isolated (16 out of 133, 12%), followed by *Stenotrophomonas maltophilia* (8 out of 133, 6%), rhinovirus (7 out of 133, 5%) and influenza virus A (7 out of 133, 5%). Demographics and clinical characteristics are presented in table 1. Patients with CMV were more likely to have received systemic corticosteroids previously (49% versus 21%, p=0.002), were more frequently immunosuppressed (71% versus 48%, p=0.017), had longer hospital stays (46 days versus 35 days, p=0.017) and had higher 30-day mortality rates (64% versus 41%, p=0.024). Multivariate logistic regression analysis revealed that previous use of corticosteroids (OR 3.46, 95% CI 1.53–7.86) was the only risk factor for positive detection of CMV. The area under the ROC curve was 0.64 (95% CI 0.52–0.75) for the predictive model of positive detection of CMV. The only variable included in the model demonstrated robust results, with a small 95% CI around the original coefficient.

In testing for CMV in BAL, results were positive in 35 out of 133 ICU patients (26%) which is a lower incidence than previously published [6]. However, it is remarkable that 29% of the patients who tested positive for CMV in BAL were immunocompetent. Immunosuppression was associated with a positive CMV result, which is mainly related to the systemic corticosteroid use. The detection of CMV in BAL was associated with a longer hospital stay and higher mortality, as described previously [3, 12]. The mechanism that could explain this is complex, involving direct CMV pathogenicity [13] or indirect CMV effects [14] such as CMV-mediated immunosuppression [15] and CMV-mediated lung injury. Length of ICU stay was longer in the group of patients with CMV but this was not statistically significant, probably because of the sample size.

All of these studies are observational, which leads us to the question of whether there is a causal relationship between CMV infection and unfavourable outcomes. A CMV-induced mouse infection study showed that anti-CMV treatment improved outcomes in CMV pneumonia; however, few human studies have been carried out to date [16]. One of the limitations of this study and others on this topic is the lack of a cut-off point to determine the number of copies associated with CMV infection. The diagnosis of CMV pneumonitis requires assessment of both microbiological and clinical criteria and without a clear cut-off point it is difficult to distinguish between asymptomatic or latent infection and active infection. Prospective studies comparing different diagnostic techniques and taking into account the treatment and evolution of the patient are thus necessary to standardise the criteria for the diagnosis of CMV pneumonia.

Negative associated outcomes suggest that screening for CMV would be necessary in all ICU patients with suspicion of respiratory infection. However, we stress that detection of CMV by PCR alone may be too sensitive for the diagnosis of CMV pneumonia, as the presence of CMV DNA may be related to pulmonary CMV shedding and there is a possibility of over-diagnosis and over-treatment. Additional prospective trials are necessary to confirm this hypothesis.

Andrea Vergara^{1,8}, Catia Cilloniz^{2,3,8}, Nestor Luque², Carolina Garcia-Vidal⁴, Javier Tejero⁵, Rafael Perelló⁶, Carmen María Lucena², Antoni Torres^{2,3} and María Angeles Marcos^{1,7}

¹Dept of Clinical Microbiology, Biomedical Diagnostic Center (CDB), Hospital Clínic of Barcelona, University of Barcelona, Institute for Global Health (ISGlobal), Barcelona, Spain. ²Dept of Pneumology, Institut Clínic Respiratori (ICR), Hospital Clínic of Barcelona, University of Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain. ³SGR 911, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Barcelona, Spain. ⁴Dept of Infectious Diseases, Hospital Clínic of Barcelona, Barcelona, Spain. ⁵University of Barcelona, Barcelona, Spain. ⁶Emergency Dept, Hospital Clínic of Barcelona, Barcelona, Spain. ⁷Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), Institute for Global Health (ISGlobal), Barcelona, Spain. ⁸These authors contributed equally to the study.

Correspondence: María Angeles Marcos, Carrer de Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain.
E-mail: mmarcos@clinic.cat

Received: July 03 2017 | Accepted after revision: Nov 30 2017

Support statement: This work was supported in part by Ciber de Enfermedades Respiratorias (CibeRes CB06/06/0028).

Conflict of interest: None declared.

References

- 1 Korndewal MJ, Mollema L, Tcherniaeva I, *et al.* Cytomegalovirus infection in the Netherlands: seroprevalence, risk factors, and implications. *J Clin Virol* 2015; 63: 53–58.
- 2 Bate SL, Dollard SC, Cannon MJ. Cytomegalovirus seroprevalence in the United States: the national health and nutrition examination surveys, 1988-2004. *Clin Infect* 2010; 50: 1439–1447.
- 3 Limaye AP, Kirby KA, Rubenfeld GD, *et al.* Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients. *JAMA* 2008; 300: 413–422.
- 4 Chiche L, Forel J-M, Roch A, *et al.* Active cytomegalovirus infection is common in mechanically ventilated medical intensive care unit patients. *Crit Care Med* 2009; 37: 1850–1857.
- 5 Frantzeskaki FG, Karampi E-S, Kottaridi C, *et al.* Cytomegalovirus reactivation in a general, nonimmunosuppressed intensive care unit population: incidence, risk factors, associations with organ dysfunction, and inflammatory biomarkers. *J Crit Care* 2015; 30: 276–281.
- 6 Osawa R, Singh N. Cytomegalovirus infection in critically ill patients: a systematic review. *Crit Care* 2009; 13: R68.
- 7 Kalil AC, Florescu DF. Prevalence and mortality associated with cytomegalovirus infection in nonimmunosuppressed patients in the intensive care unit. *Crit Care Med* 2009; 37: 2350–2358.
- 8 Vincent JL, Moreno R, Takala J, *et al.* The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Med* 1996; 22: 707–710.
- 9 Coiras MT, Pérez-Breña P, García ML, *et al.* Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription nested-PCR assay. *J Med Virol* 2003; 69: 132–144.
- 10 Hosmer DW, Lemeshow S. *Applied Logistic Regression*. New York, Wiley, 1989.
- 11 Efron B, Tibshirani RJ. *Monographs on statistics and applied probability 57: an introduction to the bootstrap*. Boca Raton, Chapman & Hall/CRC, 1994.
- 12 Lachance P, Chen J, Featherstone R, *et al.* Impact of cytomegalovirus reactivation on clinical outcomes in immunocompetent critically ill patients: protocol for a systematic review and meta-analysis. *Syst Rev* 2016; 5: 127.
- 13 Heining A, Jahn G, Engel C, *et al.* Human cytomegalovirus infections in nonimmunosuppressed critically ill patients. *Crit Care Med* 2001; 29: 541–547.
- 14 Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 1094–1097.
- 15 Kalil AC, Florescu DF. Is cytomegalovirus reactivation increasing the mortality of patients with severe sepsis? *Crit Care* 2011; 15: 138.
- 16 Cook CH, Zhang Y, Sedmak DD, *et al.* Pulmonary cytomegalovirus reactivation causes pathology in immunocompetent mice. *Crit Care Med* 2006; 34: 842–849.

Copyright ©ERS 2018

Resultados adicionales 1.

Vergara A, Alejo-Cancho I, Cervilla A, Navarro M, Rodríguez C, Vila J, Marcos MA. Evaluation of a LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) assay to detect CMV in bronchoalveolar lavages from critically ill patients. Manuscrito en preparación.

Hipótesis

Varios estudios han demostrado que la infección por CMV es común en pacientes críticos inmunocompetentes y que esto se asocia con un mal pronóstico clínico. El método molecular LAMP se ha utilizado previamente para detectar CMV en otro tipo de muestras e infecciones y podría ser una buena opción para detectar este virus en muestras respiratorias de pacientes críticos.

Objetivos

Desarrollar un ensayo LAMP para detectar CMV en LBA de pacientes ingresados en la UCI y comparar este método con una PCR comercial y con el cultivo.

Material y métodos

Se recogieron muestras de LBA de pacientes ingresados en la UCI. Para el diagnóstico de CMV, las muestras se cultivaron en fibroblastos humanos y se realizó una PCR en tiempo real tras la extracción del ADN. Se desarrolló una LAMP para la detección de CMV en LBA, tanto a partir del extracto de ADN como después de hervir la muestra o directamente sobre la muestra, y los resultados se compararon con el cultivo y la PCR.

Resultados

Resultados

Con respecto a las 38 muestras en las que se extrajo el ADN, el cultivo detectó 6/25 (24,0%) muestras positivas, mientras que la LAMP detectó 23/25 (92,0%). En cuanto a las 22 muestras en las que se realizó LAMP después de hervirlas o directamente, el cultivo detectó 5/13 (38,5%) positivos, mientras que la LAMP detectó 8/13 (61,5%) después de hervir y 7/13 (53,8%) cuando se realizó directamente. No hubo reacciones cruzadas con otros herpesvirus. La concordancia observada entre la PCR y la LAMP fue del 92,0% para la LAMP después de extraer el ADN, 77,3% para la LAMP después de hervir y 72,7% para la LAMP realizada directamente sobre la muestra. La sensibilidad de la LAMP fue del 92,0% después de la extracción de ADN, del 61,5% cuando se realizó después de hervir, y del 53,8% cuando se realizó directamente sobre la muestra. El tiempo medio de respuesta para la técnica LAMP fue de una hora.

Conclusiones

El ensayo de LAMP evaluado podría utilizarse como método de cribado para detectar CMV en muestras de LBA de pacientes en la UCI. Es un ensayo simple, barato, sensible, específico y rápido, que puede ser especialmente útil en aquellos entornos con recursos limitados y donde se requiere un diagnóstico rápido.

**Evaluation of a LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) assay to detect
citomegalovirus in bronchoalveolar lavages from critically ill patients.**

Running title: CMV detection in bronchoalveolar lavages by LAMP

Andrea Vergara¹, Izaskun Alejo-Cancho², Anna Cervilla³, Mireia Navarro³, Cristina Rodríguez³, Jordi Vila^{3,4}, M^a Angeles Marcos^{3,4,*}.

¹ Department of Clinical Microbiology and Molecular Biology CORE – CDB, Hospital Clínic; University of Barcelona, Barcelona, Spain.

² Department of Clinical Microbiology, Hospital of Galdakao, Galdakao, Spain.

³ Department of Clinical Microbiology – CDB, Hospital Clínic, Barcelona, Spain.

⁴ Institute for Global Health (ISGlobal) - University of Barcelona, Barcelona, Spain.

Abstract word count: 100

Text word count: 1187

* Corresponding author: MA. Marcos, Department of Clinical Microbiology, Hospital Clinic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. Tel. +34932275522; e-mail: 18 mmarcos@clinic.cat.

The authors declare no conflicts of interest.

Abstract

The objective of this study was to develop and evaluate a LAMP assay to detect CMV in bronchoalveolar lavage (BAL) from patients in the Intensive Care Unit (ICU). The developed LAMP was performed on 38 BAL samples after DNA extraction and on 22 samples after boiling or directly on the sample. The concordance observed between real-time PCR and LAMP was 92.0% for LAMP after DNA extraction, 77.3% for LAMP after boiling and 72.7% for direct LAMP. LAMP response time was one hour. This is the first study to evaluate a LAMP to detect CMV in respiratory samples with promising results.

Key words: cytomegalovirus, loop-mediated isothermal amplification, intensive-care unit, bronchoalveolar lavage.

Background

Cytomegalovirus (CMV) is a DNA virus in the *Herpesvirus* family. The seroprevalence of human CMV is very high worldwide (1,2). Following primary infection, the virus remains latent, being able to cause recurrences (3). Moreover, those with prior infection (seropositive) may become reinfected with a new strain of CMV (3). The immune system keeps the virus under control in most patients, but in patients who are immunocompromised, CMV replication may be uncontrolled and cause disease (3). Disease caused by CMV ranges from an asymptomatic state to a mononucleosis-like syndrome to severe diseases such as pneumonia, retinitis or gastrointestinal infection (3).

CMV is recognized as an important pathogen in immunocompromised individuals (4), but its role in immunocompetent patients is unclear and controversial. Several studies have shown that CMV infection is common in immunocompetent critically ill patients and that this is associated with a poor clinical outcome (5,6).

Traditionally, CMV has been studied by cell culture, but it presents two main limitations: low sensitivity and long time required for the virus to grow (7,8). Molecular techniques have represented an important advance in both sensitivity and response time, however they remain expensive techniques (9,10).

The molecular technique reaction based on the loop-mediated isothermal amplification (LAMP), developed in 2000 by Notomi *et al.* (11), is a rapid, simple, cheap and constant temperature nucleic acid amplification method. This method is very sensitive and specific, and there are numerous publications regarding its use in a wide range of applications (12,13). LAMP is characterized by the use of four different

primers to amplify six distinct regions on the target gene, an additional pair of primers to accelerate the reaction and a polymerase with high strand displacement activity in addition to a replication activity. LAMP has previously been used to identify CMV with promising results (14–16).

The objective of this study was to develop a LAMP assay to detect CMV in bronchoalveolar lavage (BAL) from patients admitted to the Intensive Care Unit (ICU) and compare this method with PCR and culture.

Methods

Consecutive BAL samples from patients admitted to ICUs of a tertiary hospital in Barcelona from 2013 to 2016 were used in the present study. BAL was cultured in human fibroblast cells and monitored for up to three weeks for signs of infection. A BAL was considered positive for CMV when a cytopathic effect was observed on conventional cell cultures and then confirmed by immunofluorescence detection of the antigen. Only information on CMV detection was used for the study and the samples were completely anonymized.

Total DNA from BAL samples was extracted using a QIAamp DNA Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) on a QIASymphony instrument (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. This extracted DNA was used to detect CMV by a commercial real-time quantitative PCR (ELITechGroup, Italy).

A set of six previously described primers against the gene encoding the CMV glycoprotein G were used, comprising two outer, two inner and two loop primers (14). The LAMP reaction was performed with 25 μL of the reaction mixture: 2.5 μL mix of primers (final concentration 0.2 μM for outer primers, 1.6 μM for inner primers and 0.4 μM for loop primers), 15 μL Isothermal Master Mix (Optigene, United Kingdom), 2.5 μL PCR grade water and 5.0 μL DNA/sample.

In 38 samples, LAMP was evaluated after DNA extraction. In 22 samples, the LAMP was performed directly on the sample or after boiling for 10 minutes. Positive samples for other *Herpesvirus* (herpes simplex virus 1 and 2, varicella-zoster virus, Epstein-Barr virus, human herpesvirus 6) were tested to prove the specificity of these LAMP primers.

Concordance between the gold standard (real-time PCR) and LAMP results was studied. Diagnostic performance was based on sensitivity, specificity, negative- and positive-predictive values. Cohen's kappa coefficient was also calculated. Linear regression and Pearson correlation coefficient were determined for the number of copies and time to positivity.

The Ethical Committee of the Hospital Clinic of Barcelona, Spain, approved the study protocol on 9, August, 2016. The study is registered as HCB/2016/0294.

Results

Regarding the 38 samples after DNA extraction, culture detected 6/25 (24.0%) positive samples, whereas LAMP detected CMV in 23/25 (92.0%) samples (Table 1).

LAMP failed to detect CMV in two cases. Regarding the 22 samples in which LAMP was performed after boiling or directly on the sample, culture detected 5/13 (38.5%) positives; whereas LAMP detected 8/13 (61.5%) after boiling and 7/13 (53.8%) when performed directly (Table 1). There were no cross-reactions with other virus belonging to the *Herpesvirus* family.

The concordance observed between real-time PCR and LAMP was 92.0% (36/38, kappa coefficient of 0.887) for LAMP after extracting the DNA, 77.3% (17/22, kappa coefficient of 0.567) for LAMP after boiling and 72.7% (16/22, kappa coefficient of 0.488) for LAMP performed directly on the sample (Table 2). The sensitivity of LAMP was 92.0% (23/25) after DNA extraction, 61.5% (8/13) when performed after boiling and 53.8% (7/13) when performed directly on the sample (Table 2). The mean response time for the cell culture was 19 days, while for the LAMP technique was one hour.

When analysing the correlation between the number of copies and the time to LAMP positivity, a weak negative linear relationship was found, although not statistically significant ($R = -0.32$; $P = 0.19$).

Discussion

LAMP assays represent a good and inexpensive alternative for the diagnosis of infections. Previous studies have evaluated LAMP to detect CMV in vitreous (14), amniotic fluid (15) and blood (15,16), but this is the first study to evaluate the use of a LAMP to detect CMV in respiratory samples. Our results showed very good concordance between real-time PCR and LAMP after DNA extraction. Cell culture

presents a low efficiency: many positives were not detected; time to results was slow; and qualified staff were required to perform and interpret this technique.

Previous studies have performed LAMP with and without DNA extraction to detect other *herpervirus* with similar results (17,18). By avoiding the extraction step, LAMP can be performed in short time and is less expensive. Here, performing LAMP directly on the sample or after boiling saved time, although the results were not so good.

Discordances between negative LAMP and positive real-time PCR might be explained by freeze and thaw cycles (DNA was probably degraded) and low number of copies in one case (less than 1000 copies/mL).

Regarding quantification, although it seems that a negative correlation between the number of copies and the time to positivity exists, a validation of this proof-of-concept including more samples is necessary.

LAMP amplification method could be used as a screening method to detect CMV in BAL samples from ICU patients. It is a simple, cheap, sensitive, specific and rapid amplification assay, which may be especially useful in those settings with limited resources and where a rapid diagnosis is required.

Acknowledgments

This work was supported by Ajut a la Recerca “Clínic-La Pedrera” 2016 (PEP:HB-16-JF-VG-C) and from the Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD16/0016/0010) and was co-financed by European Development Regional Fund “A way to achieve Europe” .

References

1. Zuhair M, Smit GSA, Wallis G, Jabbar F, Smith C, Devleeschauwer B, et al. Estimation of the worldwide seroprevalence of cytomegalovirus: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol.* 2019;29(3):e2034.
2. de Ory F, Ramírez R, García Comas L, León P, Sagües MJ, Sanz JC. Is there a change in cytomegalovirus seroepidemiology in Spain? *Eur J Epidemiol.* 2003;19(1):85-89.
3. Griffiths P, Baraniak I, Reeves M. The pathogenesis of human cytomegalovirus. *J Pathol.* 2015;235(2):288-297.
4. Linares L, Sanclemente G, Cervera C, Hoyo I, Cofán F, Ricart MJ, et al. Influence of Cytomegalovirus Disease in Outcome of Solid Organ Transplant Patients. *Transplant Proc.* 2011 Jul;43(6):2145-2148.
5. Limaye AP, Kirby KA, Rubenfeld GD, Leisenring WM, Bulger EM, Neff MJ, et al. Cytomegalovirus Reactivation in Critically Ill Immunocompetent Patients. *JAMA* [Internet]. 2008;300(4):413.
6. Vergara A, Cilloniz C, Luque N, Garcia-Vidal C, Tejero J, Perelló R, et al. Detection of human cytomegalovirus in bronchoalveolar lavage of intensive care unit patients. *Eur Respir J.* 2018;51(2):1701332.
7. Griffiths PD. Diagnosis of cytomegalovirus infection. *J Antimicrob Chemother.* 1989;23(E):11-16.
8. Drew WL. Diagnosis of Cytomegalovirus Infection. *Clin Infect Dis.*

1988;10(3):468-476.

9. Boeckh M, Boivin G. Quantitation of Cytomegalovirus: Methodologic Aspects and Clinical Applications. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(3):533-554.
10. Drew WL. Laboratory diagnosis of cytomegalovirus infection and disease in immunocompromised patients. *Curr Opin Infect Dis.* 2007;20(4):408-411.
11. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(12):e63.
12. Dhama K, Karthik K, Chakraborty S, Tiwari R, Kapoor S, Kumar A, et al. Loop-mediated Isothermal Amplification of DNA (LAMP): A New Diagnostic Tool Lights the World of Diagnosis of Animal and Human Pathogens: A Review. *Pakistan J Biol Sci.* 2014;17(2):151-166.
13. Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Expansion of its practical application as a tool to achieve universal health coverage. *J Infect Chemother.* 2020 Jan;26(1):13-17.
14. Reddy AK, Balne PK, Reddy RK, Mathai A, Kaur I. Development and Evaluation of Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid and Inexpensive Detection of Cytomegalovirus DNA in Vitreous Specimens from Suspected Cases of Viral Retinitis. *J Clin Microbiol.* 2010;48(6):2050-2052.
15. Wang X, Li X, Hu S, Qu H, Zhang Y, Ni H, et al. Rapid detection of active human cytomegalovirus infection in pregnancy using loop-mediated isothermal

amplification. *Mol Med Rep.* 2015;12(2):2269-2274.

16. Suzuki R, Yoshikawa T, Ihira M, Enomoto Y, Inagaki S, Matsumoto K, et al. Development of the loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of cytomegalovirus DNA. *J Virol Methods.* 2006;132(1-2):216-221.
17. Kobayashi T, Yagami A, Suzuki K, Ihira M, Yoshikawa T, Matsunaga K. Clinical utility of loop-mediated isothermal amplification assay for the diagnosis of common alpha herpesvirus skin infections. *J Dermatol.* 2013;40(12):1033-1037.
18. Vergara A, Vendrell R, Alejo-Cancho I, Rodríguez C, Vila J, Marcos MA. Rapid detection of herpes simplex virus-1 from bronchoalveolar lavage fluids using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2019;37(5):353-354.

Tables

Table 1. Performance of culture and LAMP on extracted DNA (above) and after boiling or directly on the sample (below) compared to the gold standard (real-time PCR).

		Real-time PCR	
		Positive	Negative
Culture	Positive	6 (24.0 %)	0 (0%)
	Negative	19 (76.0 %)	13 (100%)
LAMP on extracted DNA	Positive	23 (92.0 %)	0 (0%)
	Negative	2 (8.0 %)	13 (100%)
TOTAL		25	13
Culture	Positive	5 (38.5%)	0 (0%)
	Negative	8 (61.5%)	9 (100%)
LAMP on boiled BAL	Positive	8 (61.5%)	0 (0%)
	Negative	5 (38.5%)	9 (100%)
LAMP on BAL directly	Positive	7 (53.8%)	0 (0%)
	Negative	6 (46.2%)	9 (100%)
TOTAL		13	9

BAL: broncholaveolar lavage.

Table 2. Sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of LAMP (using DNA obtained by extraction or performed after boiling or directly on the sample) for CMV detection from BAL.

	LAMP		
	Extract	Boiling	Direct
Sensitivity (% CI95%)	92.0 (72.5-98.6)	61.5 (32.3-84.9)	53.8 (26.1-79.6)
Specificity (% CI95%)	100 (71.7-100)	100 (62.9-100)	100 (62.9-100)
PPV (% CI95%)	100 (82.2-100)	100 (59.8-100)	100 (56.1-100)
NPV (% CI95%)	86.7 (58.4-97.7)	64.3 (35.6-86.0)	60.0 (32.9-82.5)
Kappa coefficient	88.7 (73.6-100)	56.7 (26.6-86.8)	48.8 (18.8-78.8)

CMV: cytomegalovirus; BAL: bronchoalveolar lavage.

Evaluación de una técnica LAMP para la detección de beta-lactamasas en bacterias causantes de NIH/NAVM.

Artículo 4.

García-Fernández S, Morosini MI, Marco F, Gijón D, Vergara A, Vila J, Ruiz-Garbajosa P, Cantón R. Evaluation of the eazyplex® Superbug CRE system for rapid detection of carbapenemases and extended-spectrum β -lactamasas in clinical *Enterobacteriaceae* isolates recovered at two Spanish hospitals. J Antimicrob Chemother 2015; 70 (4): 1047-1050.

Hipótesis

La detección rápida de microorganismos productores de carbapenemasas, capaces de colonizar y/o infectar tanto a pacientes comunitarios como intrahospitalarios, es fundamental en la implementación de medidas de contención para prevenir y limitar la propagación de estos aislamientos.

Objetivos

Evaluar el sistema eazyplex® SuperBug CRE, basado en LAMP, para confirmar la presencia de carbapenemasas y BLEE tipo CTX-M en cepas clínicas de *Enterobacterales* previamente caracterizadas fenotípicamente y/o genotípicamente.

Resultados

Material y métodos

Una colección de 94 cepas productoras de carbapenemasas con/sin BLEE previamente caracterizadas por PCR convencional y secuenciación, así como 45 aislamientos recogidos prospectivamente con fenotipos compatibles con la presencia de carbapenemasas se analizaron con el sistema eazyplex® SuperBug CRE. Los resultados se evaluaron para establecer la precisión de este sistema rápido basado en LAMP, así como para determinar la concordancia entre métodos.

Resultados

El sistema eazyplex® SuperBug CRE detectó correctamente la presencia de carbapenemasas con o sin CTX-M en el 100% de las cepas incluidas. Los resultados de las determinaciones realizadas con el sistema eazyplex® SuperBug CRE se obtuvieron en 15 min.

Conclusiones

El sistema eazyplex® SuperBug CRE demostró ser una buena herramienta para la detección de diferentes carbapenemasas, así como BLEE tipo CTX-M en *Enterobacterales* con un tiempo de respuesta rápido. La prueba presenta una alta sensibilidad y especificidad. Estos resultados demuestran la potencial utilidad de esta prueba para la confirmación rápida en la rutina del laboratorio de *Enterobacterales* productores de carbapenemasas.

Evaluation of the eazyplex[®] SuperBug CRE system for rapid detection of carbapenemases and ESBLs in clinical Enterobacteriaceae isolates recovered at two Spanish hospitals

Sergio García-Fernández¹, María-Isabel Morosini^{1,2*}, Francesc Marco^{3,4}, Desirèe Gijón^{1,2}, Andrea Vergara^{3,4}, Jordi Vila^{3,4}, Patricia Ruiz-Garbajosa^{1,2} and Rafael Cantón^{1,2}

¹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain; ²Red Española de Investigación en Patología Infecciosa, Madrid, Spain; ³Department of Clinical Microbiology, CDB, Hospital Clínic, School of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ⁴Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), Barcelona, Spain

*Corresponding author. Tel: +34-91-3368330; E-mail: mariaisabel.morosini@salud.madrid.org

Received 29 July 2014; returned 25 September 2014; revised 27 October 2014; accepted 30 October 2014

Objectives: To evaluate the performance of the eazyplex[®] SuperBug CRE system, a loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based system, for confirming the presence of carbapenemases in addition to CTX-M-type ESBLs in previously genotypically and/or phenotypically characterized clinical Enterobacteriaceae isolates recovered in two centres in Spain.

Methods: A collection of 94 carbapenemase-producing strains previously characterized by conventional PCR and sequencing and a total of 45 prospectively collected isolates with phenotypes compatible with the presence of a carbapenemase were tested with the eazyplex[®] SuperBug CRE system. In both cases, the presence of an ESBL was also assessed. Results were evaluated to establish the accuracy of this rapid LAMP-based system as well as to determine the concordance between all approaches.

Results: The eazyplex[®] SuperBug CRE system correctly detected *bla* carbapenemase genes with or without *bla*_{CTX-M} genes in 100% of the molecularly characterized strains. Absolute concordance (100%) was also observed in the case of isolates with phenotypes compatible with the presence of a carbapenemase with or without an ESBL inferred by susceptibility patterns and phenotypic inhibitory profiles. Determinations performed with the eazyplex[®] SuperBug CRE system took 15 min.

Conclusions: The eazyplex[®] SuperBug CRE system proved to be a powerful tool for the detection of different carbapenemases as well as CTX-M-type ESBLs in Enterobacteriaceae with a rapid resolution time. The test has the high-performance parameters attributable to the sensitivity and specificity already demonstrated by LAMP-based assays. These results assure the usefulness of this test for routine rapid confirmation of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae.

Keywords: isothermal amplification, β -lactamases, LAMP

Introduction

The emergence and subsequent wide dissemination of a variety of bacterial species producing acquired carbapenemases encoded by transmissible plasmids are responsible for an unprecedented public healthcare threat of global dimensions.^{1,2} Rapid detection of these types of isolates, capable of efficaciously colonizing and/or infecting both community and in-hospital patients, is essential to implement containment measures to prevent and limit the

spread of carbapenemase producers.³ This detection is complex due to the increasing diversity of carbapenemase enzymes with variable expression rendering different phenotypes.^{4,5}

The aim of this study was to evaluate the performance of the eazyplex[®] SuperBug CRE system using: (i) a collection of genotypically characterized carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) isolates; and (ii) a group of contemporary clinical isolates with a carbapenemase-producer phenotype prospectively collected in two Spanish hospitals.

Materials and methods

The eazyplex[®] SuperBug CRE system (Amplex Biosystems GmbH, Giessen, Germany) is a qualitative genotypic diagnostic test, consisting of a freeze-dried, ready-to-use mixture for an isothermal amplification reaction that covers carbapenemase variants of the VIM (-1 to -37), NDM (-1 to -7) and KPC (-2 to -15) families, part of the OXA-48 family (-48, -162, -204 and -244; excluding OXA-181) and the CTX-M-1 and CTX-M-9 ESBL families from Gram-negative bacteria. Amplification products that are generated by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) are visualized by real-time fluorescence measurement of a fluorescent dye bound to double-stranded DNA using the GENIE[®] II (OptiGene, Horsham, UK) instrument.⁶

Table 1. Characteristics of the 94 Enterobacteriaceae isolates with characterized carbapenemase-mediated resistance mechanisms with or without ESBL-mediated resistance mechanisms

Resistance mechanisms	Microorganisms (no. of isolates)
KPC-2	<i>K. pneumoniae</i> (2), <i>Enterobacter cloacae</i> (2), <i>E. coli</i> (1)
KPC-3	<i>K. pneumoniae</i> (22), <i>E. cloacae</i> (1), <i>E. coli</i> (2)
KPC-3 + CTX-M-15	<i>K. pneumoniae</i> (1)
VIM-1	<i>K. pneumoniae</i> (2), <i>Klebsiella oxytoca</i> (1), <i>E. coli</i> (2), <i>E. cloacae</i> (3), <i>Citrobacter freundii</i> (1), <i>Serratia marcescens</i> (2), <i>Raoultella ornithinolytica</i> (1)
VIM-1 + CTX-M-10	<i>K. oxytoca</i> (1)
VIM-1 + CTX-M-15	<i>K. pneumoniae</i> (1), <i>K. oxytoca</i> (1)
VIM-1 + CTX-M-32	<i>E. coli</i> (1)
VIM-1 + CTX-M-14	<i>K. oxytoca</i> (1)
NDM-1	<i>Providencia rettgeri</i> (1)
NDM-5	<i>E. coli</i> (1)
OXA-48	<i>K. pneumoniae</i> (3), <i>K. oxytoca</i> (1), <i>E. coli</i> (2), <i>E. cloacae</i> (1), <i>Citrobacter koseri</i> (1), <i>Citrobacter braakii</i> (1)
OXA-48 + CTX-M-15	<i>K. pneumoniae</i> (30), <i>E. coli</i> (2), <i>Enterobacter aerogenes</i> (1), <i>Citrobacter amalonaticus</i> (1)
OXA-48 + CTX-M-14	<i>E. coli</i> (1)

Table 2. Contemporary clinical Enterobacteriaceae isolates: compared performance between the eazyplex[®] SuperBug CRE system and the inferred resistance phenotype

Phenotypically inferred resistance mechanisms (no. of isolates)	Microorganisms (no. of isolates)	Resistance mechanisms identified by the eazyplex [®] SuperBug CRE system (no. of isolates)
Class A carbapenemase (1)	<i>E. cloacae</i> (1)	KPC (1)
MBL (9)	<i>K. pneumoniae</i> (2), <i>K. oxytoca</i> (1), <i>E. cloacae</i> (4), <i>E. aerogenes</i> (1), <i>C. freundii</i> (1)	VIM (9)
MBL + ESBL (2)	<i>E. coli</i> (1), <i>E. cloacae</i> (1)	VIM + CTX-M-1-group (2)
OXA-48 family (8)	<i>K. pneumoniae</i> (3), <i>E. coli</i> (3), <i>C. freundii</i> (1), <i>R. ornithinolytica</i> (1)	OXA-48 (8)
OXA-48 family + ESBL (22)	<i>K. pneumoniae</i> (21), <i>E. coli</i> (1)	OXA-48 + CTX-M-1-group (22)
OXA-48 family + ESBL (3)	<i>Kluyvera ascorbata</i> (2), <i>E. coli</i> (1)	OXA-48 + CTX-M-9-group (3)

MBL, metallo- β -lactamase.

Detection of carbapenemase and ESBL genes, which takes 15 min, is performed for Gram-negative single bacterial colonies according to the manufacturer's instructions (<http://www.hyplex.de>).

In this study, all tested isolates were Enterobacteriaceae recovered at the microbiology laboratories of the Ramón y Cajal University Hospital (Madrid, Spain) and the Clinic University Hospital (Barcelona, Spain). A collection (2009–13) of 94 strains with carbapenemase genes previously characterized at the molecular level, with or without concomitant ESBL genetic determinants, was included (Table 1). Molecular typing was performed by conventional PCR assays and sequencing according to previously published studies.^{7–9} Additionally, a total of 45 prospectively collected routine clinical isolates (February–June 2014) with phenotypic resistance compatible with the presence of a carbapenemase, with or without an ESBL, were also tested (Table 2). In this latter group, the first approach towards the possible presence of a carbapenemase was inferred from the β -lactam MIC profiles obtained with the MicroScan System (Siemens, West Sacramento, CA, USA) or the Phoenix System (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA) considering the updated EUCAST clinical breakpoints and the corresponding guidelines for detection of these organisms.^{10,11} These isolates were then submitted to the eazyplex[®] SuperBug CRE system test and, simultaneously, to assessment of the inhibition-based profile using the ROSCO KPC/Metallo- β -lactamase and OXA-48 Confirm Kit (ROSCO Diagnostica, Taastrup, Denmark) and the modified Hodge test (MHT).¹² Detection of ESBLs was performed by the double-disc synergy test.¹³ *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 (KPC-2 producer) were used as negative and positive controls, respectively. Genetic relatedness among the most numerous *K. pneumoniae* subgroups was previously determined.^{9,14}

Results and discussion

Considering the collection of genotypically characterized CPE isolates, 100% agreement was observed between PCR and sequencing and the eazyplex[®] SuperBug CRE system results (Table 1). Again, when analysing contemporary isolates, 100% concordant results were found between both the inferred phenotype and the eazyplex[®] SuperBug CRE system results (Table 2). Moreover, full consistency was observed with the carbapenemase inhibition profile given by specific ROSCO tablets and the MHT when combining both test results. Furthermore, the double-disc synergy test was sensitive enough to confirm the presence of an ESBL when coexpressed with a carbapenemase. Cycle threshold (Ct) values

(minutes:seconds) for the genes detected by the eazyplex[®] SuperBug CRE system ranged from 4:00 to 7:00 for the VIM group, from 4:45 to 8:00 for the OXA-48 group, from 5:15 to 9:45 for the KPC group, from 3:45 to 7:30 for the CTX-M group and from 4:00 to 4:45 for the NDM group; the range was 6:00–10:45 for the internal control amplification. A limitation of our study was the lack of isolates expressing more than one carbapenemase simultaneously, which made this aspect untestable, although this epidemiological feature is still infrequent in Spain.^{14–16} Interestingly, high-risk clones currently circulating in Spain were observed. Overall, the KPC-3-producing *K. pneumoniae* isolates included ST384, ST659 and ST454, while ST20, ST11 and ST971 were less represented. Moreover, among the *K. pneumoniae* isolates harbouring OXA-48+CTX-M-1-group, two dominant clones were represented: ST11 and ST405.

Infected patients with CPE have increased mortality rates and thus require timely and rapidly efficacious treatment.¹⁷ Moreover, colonization with these types of isolates requires rapid detection to prevent and limit their dissemination in the hospital environment. It has been recently stressed that the control of their spread is still possible and mainly relies on the use of rapid diagnostic techniques and strict implementation of hygiene measures.³ The availability of a rapid test for confirming the presence of such resistance determinants is also essential to expedite therapeutic decision making. However, heterogeneous expression of carbapenemases and complex phenotypes may hamper laboratory detection by conventional phenotypic confirmatory tests including automated antimicrobial susceptibility systems, even with updated carbapenem breakpoint values. Moreover, in many cases, long response times with these methods as well as with conventional PCR techniques may not be clinically useful, particularly in the case of severely ill patients. The eazyplex[®] SuperBug CRE system demonstrated high versatility and accuracy for the rapid detection of isolates harbouring various carbapenemase resistance determinants. It is of note that the ample spectrum of genes and gene variants included in this system reflects those mostly prevalent worldwide. Other rapid tests have also been implemented, including colorimetric assays such as the Carba NP test and the Blue-Carba test (ROSCO Diagnostica).^{18,19} Although they have been coupled with the use of β -lactamase inhibitors for the discrimination of carbapenemase types, they still have lower discriminative capacity than that observed in our study.^{20,21} Moreover, false negative results have been observed with such colorimetric tests with some mucoid isolates, especially isolates with low carbapenemase activity, particularly OXA-48-like producers.²¹

In summary, the eazyplex[®] SuperBug CRE system represents a promising platform with optimal sensitivity for the rapid detection of many of the most prevalent carbapenemase and ESBL genes among clinical CPE and should be considered for routine use. Future cost-effectiveness studies should also be performed to demonstrate the system's usefulness for rapid implementation of control measures and therapeutic decision making.

Funding

This study was supported by Amplex BioSystems GmbH and Menarini Diagnostics S.A., the Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III, cofinanced by European Regional Development Fund

(ERDF) 'A Way to Achieve Europe', the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015), the Spanish Ministry of Health (grant number FIS 11/02024) and the European Commission (grants R-GNOSIS-FP7-HEALTH-F3-2011-282512, SATURN-FP7-HEALTH-F3-2009241796). This study was also supported by grant 2014SGR653 from the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació, of the Generalitat de Catalunya, Spain. D. G. was supported by a Río Hortega postdoctoral contract from the Instituto de Salud Carlos III of Spain.

Transparency declarations

None to declare.

References

- Cantón R, Akova M, Carmeli Y *et al.* Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2012; **18**: 413–31.
- Tzouveleki LS, Markogiannakis A, Psychogiou M *et al.* Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev* 2012; **25**: 682–707.
- Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect* 2014; **20**: 821–30.
- Hrabák J, Chudáčková E, Papagiannitsis CC. Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clin Microbiol Infect* 2014; **20**: 839–53.
- Nordmann P, Gniadowski M, Giske CG *et al.* Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect* 2012; **18**: 432–8.
- Solanki R, Vanjari L, Ede N *et al.* Evaluation of LAMP assay using phenotypic tests and conventional PCR for detection of *bla*_{NDM-1} and *bla*_{KPC} genes among carbapenem-resistant clinical Gram-negative isolates. *J Med Microbiol* 2013; **62**: 1540–4.
- Pitar C, Solé M, Roca I *et al.* First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 4398–401.
- Solé M, Pitar C, Roca I *et al.* First description of an *Escherichia coli* strain producing NDM-1 carbapenemase in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 4402–4.
- Ruiz-Garbajosa P, Curiao T, Tato M *et al.* Multiclonal dispersal of KPC genes following the emergence of non-ST258 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clones in Madrid, Spain. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 2487–92.
- EUCAST. *Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters, Version 4.0.* 2014. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_4.0.pdf.
- Giske GC, Martínez-Martínez L, Cantón R *et al.* EUCAST Guidelines for Detection of Resistance Mechanisms and Specific Resistances of Clinical and/or Epidemiological Importance. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-fourth Informational Supplement M100-S24.* CLSI, Wayne, PA, USA, 2014.
- Drieux L, Brossier F, Sougakoff W *et al.* Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect* 2008; **14** Suppl 1: 90–103.

- 14** Gijón D, Morosini MI, García-Fernández S *et al.* Multiclonal spread of OXA-48 producers including CG258 (ST11) *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae in a VIM and KPC carbapenemase-endemic hospital and emergence in non-hospitalized patients. In: *Abstracts of the Twenty-fourth European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, 2014*. Abstract P-1088. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Basel, Switzerland.
- 15** Oteo J, Calbo E, Rodríguez-Baño J *et al.* The threat of the carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Spain: positioning report of the SEIMC study groups, GEIH and GEMARA. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2014; doi:10.1016/j.eimc.2014.02.011.
- 16** Porres-Osante N, Azcona-Gutiérrez JM, Rojo-Bezares B *et al.* Emergence of a multiresistant KPC-3 and VIM-1 carbapenemase-producing *Escherichia coli* strain in Spain. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 1792–5.
- 17** Akova M, Daikos GL, Tzouveleki L *et al.* Interventional strategies and current clinical experience with carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* 2012; **18**: 439–48.
- 18** Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2012; **18**: 1503–7.
- 19** Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-Carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *J Clin Microbiol* 2013; **51**: 4281–3.
- 20** Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 6437–40.
- 21** Tijet N, Boyd D, Patel SN *et al.* Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 4578–80.

Artículo 5.

Vergara A, Zboromyrska Y, Mosqueda N, Morosini MI, García-Fernández S, Roca I, Cantón R, Marco F, Vila J. 2014. Evaluation of a Loop-mediated isothermal amplification-based methodology to detect carbapenemase carriage in *Acinetobacter* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58 (12): 7538-7540.

Hipótesis

La detección rápida de aislados de *Acinetobacter* spp. productores de carbapenemasas es fundamental para un tratamiento empírico adecuado de las infecciones causadas por esta bacteria y el control de las infecciones.

Objetivos

Evaluar la eficacia del sistema eazyplex® SuperBug complete A para detectar la presencia de carbapenemasas en una colección bien definida de aislados clínicos de *Acinetobacter* spp.

Material y métodos

Ochenta y dos cepas de *Acinetobacter* spp. no relacionadas epidemiológicamente se incluyeron para representar las carbapenemasas más comunes que se encuentran dentro de este género. Todas las cepas se testaron utilizando el kit eazyplex® SuperBug complete A, que cubre KPC, NDM, OXA-48, VIM, OXA-23, OXA-40 y OXA-58.

Resultados

Resultados

La presencia o ausencia de genes que codifican carbapenemasas se identificó correctamente para todos los aislamientos, excepto para una cepa de *A. baumannii* con IMP-2 y para la presencia de OXA-51 en todas las cepas, ya que no se incluyen oligonucleótidos específicos para identificar estos dos genes. Los resultados positivos se obtuvieron en <15 min.

Conclusiones

El sistema eazyplex® SuperBug complete A permite la amplificación y detección de genes diana en un solo paso a una temperatura constante y proporciona resultados rápidos y fiables. La implementación de este sistema en los laboratorios clínicos de rutina proporciona a los médicos información valiosa temprana para el manejo preciso de los pacientes con infecciones causadas por especies de *Acinetobacter* resistentes a los carbapenémicos. Sin embargo, las muestras negativas deben evaluarse con métodos alternativos (pruebas de sensibilidad antimicrobiana y PCR convencional) para detectar la presencia de genes de resistencia no incluidos en el ensayo.

Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification-Based Methodology To Detect Carbapenemase Carriage in *Acinetobacter* Clinical Isolates

Andrea Vergara,^a Yuliya Zboromyrska,^a Noraida Mosqueda,^b María Isabel Morosini,^c Sergio García-Fernández,^c Ignasi Roca,^b Rafael Cantón,^c Francesc Marco,^{a,b} Jordi Vila^{a,b}

Department of Clinical Microbiology, CDB, Hospital Clinic, School of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain^a; Centre for International Health Research (CRESIB-Hospital Clinic), Barcelona, Spain^b; Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain^c

Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* is a major source of nosocomial infections worldwide and is mainly associated with the acquisition of OXA-type carbapenemases and, to a lesser extent, metallo- β -lactamases (MBLs). In this study, 82 nonepidemiologically related *Acinetobacter* strains carrying different types of OXA or MBL enzymes were tested using the Eazyplex system, a loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based method to rapidly detect carbapenemase carriage. The presence/absence of carbapenem-hydrolyzing enzymes was correctly determined for all isolates in <30 min.

Acinetobacter baumannii is considered a nosocomial pathogen responsible for a wide spectrum of infections, affecting critically ill patients and causing high mortality rates in the intensive care unit (ICU) (1). Multidrug-resistant *A. baumannii* strains are increasingly common, thus challenging the choice for optimal treatment (2). The use of carbapenems in combined therapy is considered the treatment of choice for such infections, but resistance to this group of antibiotics has increased during the last decade and needs to be carefully monitored (1, 3). In Spain, only 14 to 18% of the *A. baumannii* isolates recovered in 2010 were carbapenem susceptible, showing a significant decrease compared to 2000, when up to 60% of all isolates were susceptible (4, 5).

The mechanisms involved in carbapenem resistance in *A. baumannii* include carbapenemase production, the reduced expression of outer membrane proteins, the overexpression of efflux pump(s), and altered penicillin-binding proteins (6). Among these mechanisms, the production of carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases is by far the most common carbapenem resistance mechanism worldwide, followed by the acquisition of class B metallo- β -lactamases and, less frequently, class A carbapenemases, such as *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) (7).

Carbapenem-hydrolyzing oxacillinases are divided into six groups: OXA-51/-69, which is chromosomally encoded in *A. baumannii*, and five clusters of acquired OXA enzymes (OXA-23, OXA-40, OXA-58, OXA-143, and OXA-235) (7–9). OXA-23 and OXA-58 are reported worldwide (1, 10), while OXA-40 is highly prevalent in Spain, Portugal, and Croatia (11–13). Enzymes belonging to the OXA-143 and OXA-235 clusters have recently been associated with North, Central, and South America (8, 9). Despite being less widespread, metallo- β -lactamases also contribute to carbapenem resistance in *Acinetobacter* spp., although only the IMP, VIM, SIM, and NDM types have been described in this genus so far (6). Of note, NDM-producing *Acinetobacter* spp. currently constitute an emerging threat in Asia and the Middle East (14).

The rapid detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter* isolates is fundamental for adequate empirical treatment and infection control purposes. The Eazyplex system (Amplex-Diagnostics GmbH, Germany) combines loop-mediated isother-

mal amplification (LAMP) of the target and real-time photometric detection of amplified material for rapid and simple detection of carbapenemase-encoding genes (15). The aim of this study was to evaluate the efficacy of Eazyplex for detecting carbapenemase carriage in a well-defined collection of *Acinetobacter* clinical isolates.

Eighty-two nonepidemiologically related strains of *Acinetobacter* spp. were included to represent the most common carbapenemases likely encountered within this genus: 15 carbapenem-susceptible *A. baumannii* strains harboring only the chromosomally encoded OXA-51 enzyme, 19 *A. baumannii* strains containing the *bla*_{OXA-40} gene, 24 *A. baumannii* strains containing *bla*_{OXA-58}, 20 *A. baumannii* strains with *bla*_{OXA-23}, 3 additional strains carrying NDM enzymes (1 NDM-2-producing *A. baumannii* and 2 NDM-1-producing *A. pittii*), and 1 *A. baumannii* strain harboring *bla*_{IMP-2}. The species identifications of all isolates were confirmed by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (16) and amplified rRNA gene restriction analysis (ARDRA) (17). The MICs of imipenem and meropenem were determined using Etest strips (bioMérieux, Madrid, Spain) and interpreted according to EUCAST guidelines (version 4.0, 2014 [<http://www.eucast.org>]). The presence of genes encoding carbapenemases was confirmed by PCR and DNA sequencing (18–21), with all strains but the two from *A. pittii* being positive for *bla*_{OXA-51}, which is in good agreement with previous reports indicating intrinsic carriage of *bla*_{OXA-51} in *A. baumannii* (22).

All strains were tested using the Eazyplex SuperBug complete strips, covering KPC, NDM, OXA-48, VIM, OXA-23, OXA-40, and OXA-58, run on a Genie II instrument (OptiGene, Horsham,

Received 14 July 2014 Returned for modification 28 August 2014

Accepted 10 September 2014

Published ahead of print 15 September 2014

Address correspondence to Jordi Vila, jvila@ub.edu.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.03870-14

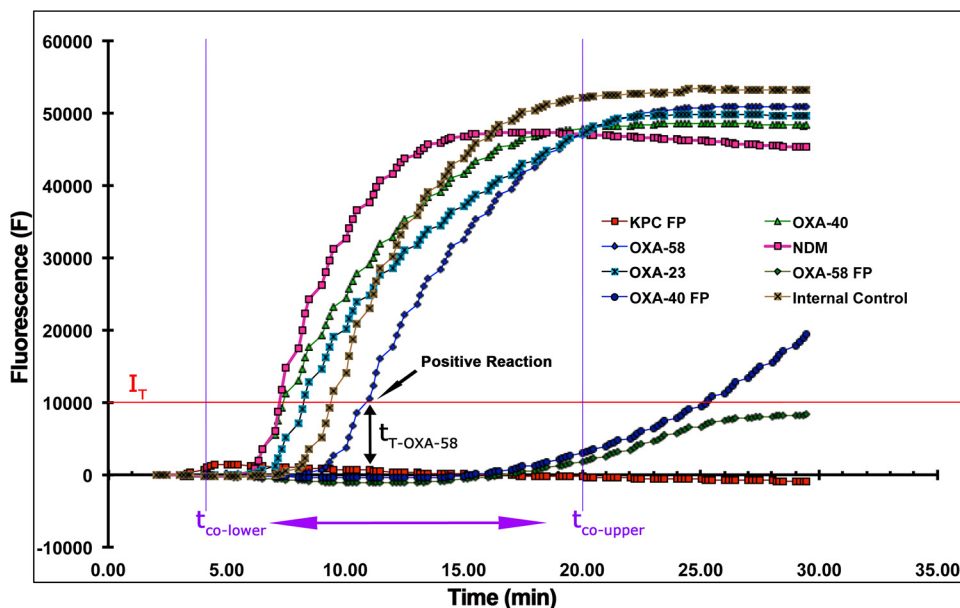


FIG 1 Loop-mediated isothermal amplification (fluorescence arbitrary units [F]) over time of carbapenemase-encoding genes from representative *Acinetobacter* spp. strains harboring OXA-23, OXA-40, OXA-58, and NDM enzymes. I_T , fluorescence intensity threshold; t_T , threshold time; $t_{co-lower}$ and $t_{co-upper}$, lower and upper cutoff time values, respectively; FP, false positive. The black arrow indicates the t_T value for the OXA-58 reaction that defines a positive result.

United Kingdom) for target isothermal amplification and detection. A single bacterial colony for each strain was suspended in 500 μ l of resuspension and lysis fluid (RALF) and incubated in a thermal block (99°C) for 2 min. Fifty milliliters of the cell suspension was incubated in blood agar before lysis to test for bacterial contamination. Twenty-five milliliters of the RALF suspension was added to each tube of the strip containing the ready-to-use mastermix. Air bubbles were removed by gently knocking the tubes, and each strip was immediately placed into the Genie II instrument. The reaction mixtures were incubated at 66°C for 30 min with fluorescence monitoring. Isothermal amplification was indicated by a strong increase in the fluorescence signal in the form of a typical amplification curve (Fig. 1). The Eazyplex SuperBug complete test strip contains eight caps with six oligonucleotide primers in each cap, allowing the simultaneous specific amplification of seven different resistance genes in a single run, plus an internal control. In the presence of the relevant DNA, the specific amplification products of the genes encoding KPC, NDM, VIM, OXA-48, OXA-23, OXA-40, and OXA-58 were synthesized and visualized using a real-time-fluorescence measurement of a fluorescence dye bound to double-stranded DNA. The presence or absence of carbapenemase-encoding genes was correctly identified for all isolates, except for the single *A. baumannii* strain harboring *bla*_{IMP-2} and the presence of *bla*_{OXA-51} in all strains, since the test strip does not include specific oligonucleotides to identify these two genes. Unspecific DNA amplification was observed for five samples in the KPC, OXA-58, and OXA-40 reaction tubes, which accounted for false-positive results. A set of parameters was defined according to the manufacturer's specifications in order to correctly assign positive/negative results to each individual LAMP reaction. Specifically, a fluorescence intensity threshold (I_T) value significantly above the background noise level was set at 10,000 fluorescence units to indicate when a reaction had produced double-stranded DNA (dsDNA) products; a threshold time (t_T) was

defined as the time at which the real-time fluorescence value crossed the threshold intensity value; a lower cutoff time ($t_{co-lower}$) was set at 4 min, and an upper cutoff time ($t_{co-upper}$) was set at 20 min to define lower and upper limits of the acceptable threshold values. Isothermal amplification of target DNA was only considered truly positive when the fluorescence values for a specific reaction crossed the fluorescence intensity threshold within the range set by the cutoff times ($t_{co-lower} < t_T < t_{co-upper}$). Using these parameters, not only were false-positive amplifications easily identified, but they allowed the detection of true-positive results before the end of the run. The positive t_T values for all target genes and the internal control ranged between 7 and 15 min (Fig. 1). Overall, better results were achieved when a small fraction of a colony was used instead of fully loading a sterile loop, which either inhibited the amplification reaction or increased unspecific amplification (data not shown).

The Eazyplex test system allows the amplification and detection of target genes in a single step at a constant temperature and provides highly reliable results in <15 min. The implementation of this system in routine clinical laboratories provides clinicians with early valuable information for the accurate management of patients with infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter* species. In addition, the Eazyplex SuperBug complete test has been validated by the manufacturer for the direct testing of rectal smears, suggesting that this system has the potential to test noncultured samples, such as those derived from body fluids. Detection, however, is limited to the current range of available oligonucleotides, and negative samples should be evaluated with alternative methods (antimicrobial susceptibility tests [AST] and conventional PCR) to detect the carriage of resistance genes not included in the assay. To allow reliable implementation in routine analysis, the Eazyplex system should be further expanded to include additional carbapenemase-encoding genes reported in *Acinetobacter* species.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Amplex BioSystems GmbH, the Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III, cofinanced by European Regional Development Fund (ERDF) “A way to achieve Europe,” the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015), and the Spanish Ministry of Health (grant FIS 11/02024). This study was also supported by grant 2014SGR653 from the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació of the Generalitat de Catalunya, and by funding from the European Community (SATURN, contract HEALTH-F3-2009241796).

REFERENCES

- Kempf M, Rolain JM. 2012. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int. J. Antimicrob. Agents* 39:105–114. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.10.004>.
- Dijkshoorn L, Nemeč A, Seifert H. 2007. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat. Rev. Microbiol.* 5:939–951. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1789>.
- Vila J, Pachón J. 2012. Therapeutic options for *Acinetobacter baumannii* infections: an update. *Expert Opin. Pharmacother.* 13:2319–2336. <http://dx.doi.org/10.1517/14656566.2012.729820>.
- Fernández-Cuenca F, Tomás-Carmona M, Caballero-Moyano F, Bou G, Martínez-Martínez L, Vila J, Pachón J, Cisneros JM, Rodríguez-Baño J, Pascual A, Grupo del Proyecto GEIH-REIPI-Ab 2010. 2013. *In vitro* activity of 18 antimicrobial agents against clinical isolates of *Acinetobacter* spp.: multicenter national study GEIH-REIPI-Ab 2010. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 31:4–9. (In Spanish.) <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2012.06.010>.
- Fernández-Cuenca F, Pascual A, Ribera A, Vila J, Bou G, Cisneros JM, Rodríguez-Baño J, Pachón J, Martínez-Martínez L, Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria. 2004. Clonal diversity and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolated in Spain. A nationwide multicenter study: GEIH-Ab project (2000). *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22:267–271. (In Spanish.) [http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X\(04\)73085-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X(04)73085-2).
- Roca I, Espinal P, Vila-Farrés X, Vila J. 2012. The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. *Front. Microbiol.* 3:148. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00148>.
- Poirel L, Nordmann P. 2006. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 12: 826–836. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01456.x>.
- Zander E, Bonnin RA, Seifert H, Higgins PG. 2014. Characterization of *bla*_{OXA-143} variants in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter pittii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58:2704–2708. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02618-13>.
- Higgins PG, Pérez-Llarena FJ, Zander E, Fernández A, Bou G, Seifert H. 2013. OXA-235, a novel class D β-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:2121–2126. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02413-12>.
- Mosqueda N, Espinal P, Cosgaya C, Viota S, Plasencia V, Álvarez-Lerma F, Montero M, Gómez J, Horcajada JP, Vila J, Roca I. 2013. Globally expanding carbapenemase finally appears in Spain: nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing plasmid-encoded OXA-23 in Barcelona, Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:5155–5157. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01486-13>.
- Mosqueda N, Gato E, Roca I, López M, de Alegría CR, Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, Pachón J, Cisneros JM, Rodríguez-Baño J, Pascual A, Vila J, Bou G, Tomás M, GEIH-GEMARA (SEIMC) and REIPI. 2014. Characterization of plasmids carrying the *bla*_{OXA-24/40} carbapenemase gene and the genes encoding the AbkA/AbkB proteins of a toxin/antitoxin system. *J. Antimicrob. Chemother.* 69:2629–2633. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dku179>.
- Grosso F, Quinteira S, Peixe L. 2011. Understanding the dynamics of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* lineages within Portugal. *Clin. Microbiol. Infect.* 17:1275–1279. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03469.x>.
- Goic-Barisic I, Towner KJ, Kovacic A, Sisko-Kraljevic K, Tonkic M, Novak A, Punda-Polic V. 2011. Outbreak in Croatia caused by a new carbapenem-resistant clone of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-72 carbapenemase. *J. Hosp. Infect.* 77:368–369. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2010.12.003>.
- Dortet L, Poirel L, Nordmann P. 2014. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *Biomed. Res. Int.* 2014:249856. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/249856>.
- Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK, Rao PV, Morita K. 2008. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev. Med. Virol.* 18:407–421. <http://dx.doi.org/10.1002/rmv.593>.
- Espinal P, Seifert H, Dijkshoorn L, Vila J, Roca I. 2012. Rapid and accurate identification of genomic species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group by MALDI-TOF MS. *Clin. Microbiol. Infect.* 18:1097–1103. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03696.x>.
- Vanechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg I, Elaichouni A, de Vos P, Claeys G, Verschraegen G. 1995. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J. Clin. Microbiol.* 33:11–15.
- Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, Amyes SG, Livermore DM. 2006. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents* 27:351–353. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.01.004>.
- Robledo IE, Aquino EE, Santé MI, Santana JL, Otero DM, León CF, Vázquez GJ. 2010. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:1354–1357. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00899-09>.
- Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. 2011. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 70:119–123. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>.
- Higgins PG, Lehmann M, Seifert H. 2010. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35:305. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.10.014>.
- Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. 2006. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*_{OXA-51-like} carbapenemase gene intrinsic to this species. *J. Clin. Microbiol.* 44:2974–2976. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01021-06>.

Artículo 6.

Moreno-Morales J*, Vergara A*, Kostyanev T, Rodriguez-Baño J, Goossens H, Vila J. Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification assay to detect carbapenemases from *Acinetobacter* spp. directly from bronchoalveolar lavage fluid. Front Microbiol 2021; 11:597684. *Coautores

Hipótesis

El diagnóstico rápido de patógenos causantes de NAVM es de suma importancia, ya que estos pacientes tienen estancias hospitalarias más prolongadas, necesitan más antibióticos, su tratamiento es más caro, y también tienen mayor mortalidad. *Acinetobacter* spp. y, especialmente los resistentes a carbapenémicos, se encuentran entre los patógenos más preocupantes a nivel mundial, produciendo sobre todo infección nosocomial.

Objetivos

Evaluar el kit eazyplex® SuperBug complete A, basado en LAMP para detectar la producción de carbapenemasas por cepas de *Acinetobacter* spp. directamente a partir de muestras de LBA inoculadas con estas cepas.

Material y métodos

Se seleccionaron 22 cepas de *Acinetobacter* spp. no relacionadas epidemiológicamente productoras de OXA-23, OXA-40, OXA-58, NDM e IMP. Se inocularon muestras negativas de LBA con concentraciones finales de las diferentes cepas de 10^2 y 10^3 UFC/mL. Se estableció un protocolo que consistió en una centrifugación de las muestras a altas revoluciones, adición del buffer de lisis, incubación a 99°C durante 2 min y una centrifugación final a bajas

Resultados

revoluciones. Finalmente, se añadió 25 µL del sobrenadante a cada tubo de la tira de ensayo.

Resultados

Los tiempos de detección varían según la cepa y el gen. El límite de sensibilidad fue de 10^3 UFC/mL, por lo que este kit tiene suficiente sensibilidad para la detección de carbapenemasas productoras *Acinetobacter* spp. en muestras clínicas de LBA, teniendo en cuenta que el punto de corte para LBA es de 10^4 UFC/mL. EL tiempo máximo de manipulación fue de 15 minutos por muestra y el de ejecución de 30 min (aproximadamente 45 min en total).

Conclusiones

El uso del ensayo eazyplex® SuperBug Complete A directamente en muestras de LBA podría orientar y optimizar las terapias con antibióticos antes que con las técnicas habituales utilizadas en el laboratorio, lo que probablemente significaría una disminución de la mortalidad.



Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay to Detect Carbapenemases Directly From Bronchoalveolar Lavage Fluid Spiked With *Acinetobacter* spp.

OPEN ACCESS

Edited by:

Raffaele Zarrilli,
University of Naples Federico II, Italy

Reviewed by:

Katie Hopkins,
Public Health England,
United Kingdom
Laurent Dortet,
Bicêtre Hospital, France

*Correspondence:

Jordi Vila
jvila@clinic.cat

† These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Antimicrobials, Resistance
and Chemotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 21 August 2020

Accepted: 07 December 2020

Published: 13 January 2021

Citation:

Moreno-Morales J, Vergara A,
Kostyanov T, Rodríguez-Baño J,
Goossens H and Vila J (2021)
Evaluation of a Loop-Mediated
Isothermal Amplification Assay
to Detect Carbapenemases Directly
From Bronchoalveolar Lavage Fluid
Spiked With *Acinetobacter* spp.
Front. Microbiol. 11:597684.
doi: 10.3389/fmicb.2020.597684

Javier Moreno-Morales^{1†}, Andrea Vergara^{2†}, Tomislav Kostyanov³,
Jesús Rodríguez-Baño⁴, Herman Goossens^{3,5} and Jordi Vila^{1,2*}

¹ Institute for Global Health (ISGlobal), Hospital Clínic – Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, ² Department of Clinical Microbiology – CDB, Hospital Clínic, University of Barcelona, Barcelona, Spain, ³ Department of Medical Microbiology, Vaccine and Infectious Disease Institute, University of Antwerp, Antwerp, Belgium, ⁴ Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospital Universitario Virgen Macarena/Departamento de Medicina, Universidad de Sevilla/Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Seville, Spain, ⁵ Laboratory of Medical Microbiology, University Hospital Antwerp, Antwerp, Belgium

Carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. mainly *Acinetobacter baumannii* are frequently causing nosocomial infections with high mortality. In this study, the efficacy of the Eazyplex[®] SuperBug Complete A system, based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP), to detect the presence of carbapenemases in *Acinetobacter* spp. directly from bronchoalveolar lavage (BAL) samples was assessed. A total of 22 *Acinetobacter* spp. strains producing OXA-23, OXA-40, OXA-58, NDM, and IMP were selected. Eazyplex SuperBug Complete A kit, used with the Genie II device, is a molecular diagnostics kit that detects a selection of genes that express carbapenemases (*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-40}*, and *bla_{OXA-58}*). Negative BAL samples were identified, McFarland solutions were prepared from each of the 22 *Acinetobacter* strains and serial dilutions in saline solution were made to finally spike BAL samples to a concentration of 10² and 10³ CFU/ml. Fifteen concentrations out of the 44 tested out did not provide detection of the carbapenemase-producing gene, all but one being at the lowest concentration tested at 10² CFU/ml; therefore, the limit of sensitivity is 10³ CFU/ml. This assay represents the kind of advantages that investing in molecular diagnostics brings to the clinical practice, allowing the identification of carbapenemases in less than 30 min with a sensitivity of 10³ CFU/ml.

Keywords: carbapenemases, *Acinetobacter* spp., bronchoalveolar lavage, detection, oxacillinases

INTRODUCTION

Carbapenems are potent β -lactam antibiotics with broad-spectrum and bactericidal mode of action (Codjoe and Donkor, 2017). Their use was increased due to the spread of extended spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriales* toward whom they are active (Hawkey and Livermore, 2012; Bush and Bradford, 2020). Carbapenems are considered one of the most efficacious antimicrobials to treat bacterial infections (Codjoe and Donkor, 2017). However, resistance by carbapenemases did not take long to appear, and it poses a major threat to public health (Hawkey and Livermore, 2012).

Acinetobacter spp. members and specially carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) are among the world's most dangerous pathogen threats. CRAB has been classified as a critical priority pathogen by the WHO's priority pathogens to guide research and development (R&D) of new antibiotics (Tacconelli et al., 2018; World Health Organization, 2019) and as an urgent threat that requires aggressive action by Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (Centers for Disease Control, 2019).

Even though community-acquired *Acinetobacter* infections can occur, the most common and acute infections happen in the nosocomial setting. *Acinetobacter* lurks around intensive care units and surgical wards causing a number of infections (e.g., on burns and soft tissue, urinary tract, and bloodstream) and specially ventilator-associated pneumonia (VAP) in patients under mechanical ventilation (Evans et al., 2012; Bush and Bradford, 2020).

Ventilator-associated pneumonia develops in intensive care units in patients under ventilation for at least 48 h. Rapid diagnostic of VAP-causing pathogens is of utmost importance: VAP patients not only have longer hospital stays and need more antibiotics, therefore their treatment is more expensive, but also have higher mortality (Torres et al., 2017; Bonell et al., 2019).

This study aims to evaluate Eazyplex[®] SuperBug Complete A based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detecting carbapenemase produced by *Acinetobacter* directly from inoculated bronchoalveolar lavage (BAL) samples.

MATERIALS AND METHODS

Eazyplex[®] SuperBug Complete A kit (AmplexDiagnostics GmbH, Germany), used with the Genie II device (OptiGene, Horsham, United Kingdom), is a molecular diagnostics kit that detects a selection of genes that express carbapenemases (including metallo- β -lactamases and oxacillinases). Results after detection of bacterial DNA are presented within 30 min.

The kit is composed of eight tube strips each with a mix of lyophilized agents for the amplification of one of the following seven genes: *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-40}*, and *bla_{OXA-58}*. The eighth tube is an internal inhibitory control.

Once the samples are prepared and the strip is inside the Genie II device, a LAMP is performed. The reaction is incubated at

66°C for 30 min, and detection is performed *via* fluorescence excitation, for up to two strips at a time.

A total of 22 *Acinetobacter* spp. strains producing OXA-23, OXA-40, OXA-58, NDM, and IMP were selected (Table 1). Isolate identification was performed *via* MALDI-TOF/MS (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Carbapenemase gene detection was checked *via* conventional PCR for each of the strains (Woodford et al., 2006; Kulah et al., 2010; Solé et al., 2011). The strains selected basically were epidemiologically unrelated due to its different sequence types (ST) or geographical origins.

Negative BAL samples were identified and collected at the Clinical Microbiology Laboratory from Hospital Clinic of Barcelona; samples were stored at -80°C . McFarland solutions were prepared from each of the 22 *Acinetobacter* strains, and serial dilutions in saline solution were made to finally spike BAL samples to a concentration of 10^2 and 10^3 CFU/ml.

The protocol consisted in: centrifugation of 850 μl of the 10^2 and 10^3 spiked BAL samples (at 14,000 g for 5 min), addition of 500 μl of resuspension and lysis fluid (RALF, provided with the kit) to the pellet obtained, incubation at 99°C for 2 min and a final centrifugation step (4,000 rpm for 2 min). Finally, 25 μl of the supernatant was added to each tube of the assay strip. The hands-on time took a maximum of 15 min per strain.

RESULTS AND DISCUSSION

Increasing resistance to antimicrobials and specifically carbapenems is reported in *A. baumannii* in the past years. In Spain, there has been an increase of up to 40% in *A. baumannii* clinical isolates presenting resistance to carbapenems from 2000 to 2010; 86% of the 446 *A. baumannii* clinical isolates presented resistance to carbapenems in 2010's study (Fernández-Cuenca et al., 2013).

This situation is rather common. Recently, European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) has reported $\geq 50\%$ of *Acinetobacter* spp. invasive isolates present resistance to carbapenems in Hungary, Poland, Bulgaria, Latvia, Italy, Spain, Cyprus, Romania, Lithuania, Greece, and Croatia in 2018's Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018).

Current effective antibiotics for the treatment of CRAB are scarce and are not the most suitable therapeutic agents due to poor pharmacokinetics, toxicity (as in the case of polymyxins), and emergence of resistance (Garnacho-Montero et al., 2015). Chromosome and/or plasmid encoded carbapenemases are the main mechanism of resistance to carbapenems in CRAB (Roca et al., 2012; Bush and Bradford, 2020); thus, rapid detection of carbapenemases is key to guide effective antibiotic therapies (Garnacho-Montero et al., 2015).

Although the Complete A kit is not specific for *Acinetobacter*, carbapenemase coverage is enough to check for the main carbapenemases present in *Acinetobacter*. Of all the carbapenemases described in *A. baumannii*, oxacillinases are by far the most frequently found among the most prevalent

TABLE 1 | Eazyplex SuperBug Complete A kit was used to detect carbapenemases of *Acinetobacter* spp. from spiked BAL.

Strain	Resistance gene (<i>bla</i>)	Concentration (CFU/ml)	Eazyplex SuperBug Complete A (minutes:seconds)
<i>A. baumannii</i> 1	OXA-23	10 ³	14:00
		10 ²	16:15
<i>A. baumannii</i> 2	OXA-23	10 ³	11:45
		10 ²	–
<i>A. baumannii</i> 3	OXA-23	10 ³	28:00
		10 ²	21:15
<i>A. baumannii</i> 4	OXA-23	10 ³	13:00
		10 ²	–
<i>A. baumannii</i> 5	OXA-23	10 ³	11:15
		10 ²	14:15
<i>A. baumannii</i> 6	OXA-40	10 ³	12:50
		10 ²	13:15
<i>A. baumannii</i> 7	OXA-40	10 ³	13:30
		10 ²	–
<i>A. baumannii</i> 8	OXA-40	10 ³	11:30
		10 ²	17:00
<i>A. baumannii</i> 9	OXA-40	10 ³	9:45
		10 ²	–
<i>A. baumannii</i> 10	OXA-40	10 ³	9:30
		10 ²	10:30
<i>A. baumannii</i> 11	OXA-58	10 ³	16:10
		10 ²	18:30
<i>A. baumannii</i> 12	OXA-58	10 ³	16:15
		10 ²	–
<i>A. baumannii</i> 13	OXA-58	10 ³	16:45
		10 ²	21:30
<i>Acinetobacter nosocomialis</i> 1 OXA-58 IMP-4*	OXA-58	10 ³	14:30
		10 ²	–
<i>A. baumannii</i> 14	OXA-58	10 ³	9:30
		10 ²	10:00
<i>A. baumannii</i> 15	OXA-58	10 ³	12:15
		10 ²	12:45
<i>Acinetobacter pittii</i> 1	NDM	10 ³	20:00
		10 ²	–
<i>Acinetobacter dijkshoorniae</i> 1	NDM	10 ³	18:30
		10 ²	–
<i>A. baumannii</i> 16	NDM	10 ³	–
		10 ²	–
<i>A. baumannii</i> 17	NDM	10 ³	13:45
		10 ²	–
<i>A. junii</i> 1 IMP-1*	IMP	10 ³	–
		10 ²	–
<i>A. baumannii</i> 18 IMP-2*	IMP	10 ³	–
		10 ²	–

Eazyplex® SuperBug Complete A detection time per concentration tested for each of the *Acinetobacter* spp. strains tested. “–” indicates no detection of the carbapenemase-producing gene in the concentration tested. *IMP-producing strains were included in the study to cover the range of carbapenemases found in *Acinetobacter* although not being detected in the kit.

clones, being the international clone 2 OXA-23 producing *A. baumannii* worldwide spread.

Detection of carbapenemase-producing genes in the tested strains using Eazyplex SuperBug Complete A assay is shown in **Table 1**, and the results agree with conventional PCR results. Detection time values vary per strain and gene. Only 15 concentrations tested out of 44 did not provide detection of the carbapenemase-producing gene, all being at the lowest concentration tested at 10² CFU/ml; therefore, with the limit of sensitivity being 10³ CFU/ml, we consider that this kit has enough sensitivity for the detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter* in clinical BAL samples, taking into consideration that the cut-off for BAL is 10⁴ CFU/ml.

With a maximum hands-on time of 15 min per sample and 30 min run time (approximately 45 min total), this assay proves to be a great advantage compared to routine methods in the clinical microbiology laboratory that need 16–24 h for results to be obtained. Naturally, further antimicrobial susceptibility testing should be considered in all samples. The only rapid test (4 h) that allows the detection of the most frequent pathogens causing HAP is the Unyvero Hospitalized Pneumonia (HPN; Curetis GmbH, Germany). This multiplex panel also includes some resistant markers (18 in total); among them, it can detect the genes encoding VIM, IMP, NDM, KPC, OXA-23, OXA-24, OXA-48, and OXA-58. However, as far as we know, it has not been validated for detection of carbapenemases in *A. baumannii*.

We visualize the following workflow for diagnosis of hospital-acquired pneumonia (HAP): when the sample arrives to the clinical microbiology laboratory, rapid identification of the bacteria causing HAP is performed also using an in-house LAMP reaction approach (Vergara et al., 2020a); if *A. baumannii* is identified as the pathogen causing the infection, the method to detect specific carbapenemases in *Acinetobacter* described in this study is performed. However, if Enterobacterales is detected, the same approach can be applied (Vergara et al., 2020b).

Using Eazyplex® SuperBug Complete A assay will allow to guide and optimize antibiotic therapies earlier than with usual techniques used in the laboratory, which likely means a decrease in mortality. This assay represents the kind of advantages that investing in molecular diagnostics brings to the clinical practice: allows the identification of specific resistance mechanisms in approximately 45 min and if sample identification using LAMP was included as a first step (1 h), both pathogen and resistance mechanism could be identified in less than 2 h.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JV, JR-B, and HG: conceptualization, design, and writing–review and editing. JM-M and TK: methodology. AV: supervision and

validation. JV: writing–original draft preparation and funding acquisition. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

We acknowledge support from the Spanish Ministry of Science and Innovation through the “Centro de Excelencia Severo Ochoa 2019–2023” Program (CEX2018-000806-S) and support from the Generalitat de Catalunya through the CERCA Program. We were supported by the Plan Nacional de I + D + i 2013-2016 and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, and Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD16/0016/0010)

REFERENCES

- Bonell, A., Azarrafy, R., Huong, V. T. L., Viet, T., Phu, V. D., Dat, V. Q., et al. (2019). A systematic review and meta-analysis of ventilator-associated pneumonia in adults in Asia: an analysis of national income level on incidence and etiology. *Clin. Infect. Dis.* 68, 511–518. doi: 10.1093/cid/ciy543
- Bush, K., and Bradford, P. A. (2020). Epidemiology of β -lactamase-producing pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* 33:e00047-19.
- Centers for Disease Control (2019). *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019*. Atlanta: CDC.
- Codjoe, F., and Donkor, E. (2017). Carbapenem resistance: a review. *Med. Sci.* 6:1. doi: 10.3390/medsci6010001
- European Centre for Disease Prevention and Control (2018). *Surveillance Report. Surveillance of Antimicrobial Resistance in Europe 2018*. Available online at: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/surveillance-antimicrobial-resistance-Europe-2018.pdf> (accessed July 1, 2020).
- Evans, A., Hamouda, B., and Amnyes, G. B. (2012). The rise of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Curr. Pharm. Des.* 19, 223–238. doi: 10.2174/1381612811306020223
- Fernández-Cuenca, F., Tomás-Carmona, M., Caballero-Moyano, F., Bou, G., Martínez-Martínez, L., Vila, J., et al. (2013). Actividad de 18 agentes antimicrobianos frente a aislados clínicos de *Acinetobacter baumannii*: segundo estudio nacional multicéntrico (proyecto GEIH-REIPI-Ab 2010). *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 31:353. doi: 10.1016/j.eimc.2013.03.001
- Garnacho-Montero, J., Dimopoulos, G., Poulakou, G., Akova, M., Cisneros, J. M., De Waele, J., et al. (2015). Task force on management and prevention of *Acinetobacter baumannii* infections in the ICU. *Intensive Care Med.* 41, 2057–2075. doi: 10.1007/s00134-015-4079-4
- Hawkey, P. M., and Livermore, D. M. (2012). Carbapenem antibiotics for serious infections. *BMJ* 344:e3236. doi: 10.1136/bmj.e3236
- Kulah, C., Mooij, M. J., Comert, F., Aktas, E., Celebi, G., Ozlu, N., et al. (2010). Characterisation of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak strains producing OXA-58 in Turkey. *Int. J. Antimicrob. Agents* 36, 114–118. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2010.03.017
- Moreno-Morales, J., Vergara, A., Kostyanov, T., Rodríguez-Baño, J., Goossens, H., and Vila, J. (2020). Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay to detect carbapenemases from *Acinetobacter* spp. directly from bronchoalveolar lavage fluid. *bioRxiv [Preprint]*. doi: 10.1101/2020.05.11.089904
- Roca, I., Espinal, P., Vila-Farrés, X., and Vila, J. (2012). The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. *Front. Microbiol.* 3:148. doi: 10.3389/fmicb.2012.00148
- and co-financed by the European Development Regional Fund “A way to achieve Europe,” Operative program Intelligent Growth 2014–2020. The research leading to these results was conducted as part of the COMBACTE-CARE project (Grant Number 115620). This work was also supported by award 2017 SGR 0809 from the Agència de Gestió d’Ajuts Universitaris i de Recerca of the Generalitat de Catalunya.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Ignasi Roca for kindly providing strains in this study and Thierry Naas for providing some of the strains harboring IMP. This manuscript has been released as a pre-print at <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.05.11.089904v1> (Moreno-Morales et al., 2020).

- Solé, M., Pitart, C., Roca, I., Fàbrega, A., Salvador, P., Muñoz, L., et al. (2011). First description of an *Escherichia coli* strain producing NDM-1 carbapenemase in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 4402–4404. doi: 10.1128/aac.00642-11
- Taccaroni, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., et al. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* 18, 318–327.
- Torres, A., Niederman, M. S., Chastre, J., Ewig, S., Fernandez-Vandellos, P., Hanberger, H., et al. (2017). International ERS/ESICM/ESCMID/ALAT guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia. *Eur. Respir. J.* 50:1700582. doi: 10.1183/13993003.00582-2017
- Vergara, A., Boutil, H., Ceccato, A., López, M., Cruells, A., Bueno-Freire, L., et al. (2020a). Assessment of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid detection of pathogenic bacteria from respiratory samples in patients with hospital-acquired pneumonia. *Microorganisms* 8:103. doi: 10.3390/microorganisms8010103
- Vergara, A., Moreno-Morales, J., Roca, I., Pitart, C., Kostyanov, T., Rodríguez-Baño, J., et al. (2020b). A comparative study between real-time PCR and loop-mediated isothermal amplification to detect carbapenemase and/or ESBL genes in *Enterobacteriaceae* directly from bronchoalveolar lavage fluid samples. *J. Antimicrob. Chemother.* 75, 1453–1457. doi: 10.1093/jac/dkaa031/5740616
- Woodford, N., Ellington, M., Coelho, J., Turton, J., Ward, M., Brown, S., et al. (2006). Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents* 27, 351–353. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2006.01.004
- World Health Organization (2019). *Antibacterial Agents in Clinical Development: An Analysis of the Antibacterial Clinical Development Pipeline*. Geneva: WHO.

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Moreno-Morales, Vergara, Kostyanov, Rodríguez-Baño, Goossens and Vila. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Artículo 7.

Vergara A*, Moreno-Morales J*, Roca I, Pitart C, Kostyanev T, Rodríguez-Baño J, Goossens H, Marco F, Vila J. A comparative study between Real-time PCR and LAMP to detect carbapenemase and/or extended-spectrum- β -lactamase genes in *Enterobacteriaceae* directly from bronchoalveolar lavage fluid samples. J Antimicrob Chemother 2020; 75: 1453-1457. *Coautores

Hipótesis

La aplicación de técnicas de diagnóstico rápido para identificar microorganismos patógenos y genes de resistencia a antibióticos parece tener un gran impacto en el manejo de los pacientes con NAVM, reduciendo los tratamientos antimicrobianos inapropiados o innecesarios y la mortalidad en estos pacientes.

Objetivos

Evaluar y comparar la eficacia de una PCR en tiempo real (Xpert Carba-R) y una LAMP (eazyplex® SuperBug CRE) para detectar carbapenemasas en *Enterobacterales* directamente a partir de LBA.

Material y métodos

Se incluyeron 21 cepas de *Enterobacterales* productores de carbapenemasas (4 con NDM, 5 con OXA-48, una con NDM y OXA-48, una con OXA-181, 5 con KPC, y 5 con VIM). Algunas de estas cepas también presentaban BLEE (CTXM-1 o CTXM-9). Se inocularon muestras negativas de LBA con las cepas seleccionadas hasta una concentración final de 10^2 - 10^4 UFC/ml. Se estableció un protocolo de preparación de la muestra para cada uno de los métodos (PCR o LAMP).

Resultados

Resultados

Con Xpert Carba-R se observó una concordancia del 100% con la PCR y secuenciación con todas las concentraciones. Con respecto a eazyplex® SuperBug CRE, la concordancia fue del 100%, 80% y 27% cuando se analizaron 10^4 , 10^3 y 10^2 UFC/mL, respectivamente. El tiempo de preparación para ambos ensayos fue de aproximadamente 15 minutos, pero más sencilla para Xpert Carba-R. En cuanto al tiempo hasta los resultados, con eazyplex® SuperBug CRE estuvieron disponibles en 30 minutos, mientras que Xpert Carba-R tardó alrededor de 50 minutos. Aunque observamos una buena correlación entre el valor de Ct para Xpert Carba-R y la concentración bacteriana ($r = -0,81$, $p < 0,001$), debido al número limitado de muestras no pudimos establecer un punto de corte.

Conclusiones

Las dos pruebas de diagnóstico comerciales analizadas pueden utilizarse para detectar genes de resistencia a carbapenémicos directamente en muestras del tracto respiratorio inferior.

A comparative study between real-time PCR and loop-mediated isothermal amplification to detect carbapenemase and/or ESBL genes in Enterobacteriaceae directly from bronchoalveolar lavage fluid samples

A. Vergara¹†, J. Moreno-Morales ²†, I. Roca², C. Pitart¹, T. Kostyanov³, J. Rodriguez-Baño⁴, H. Goossens^{3,5}, F. Marco^{1,2} and J. Vila ^{1,2*}

¹Department of Clinical Microbiology – CDB, Hospital Clinic, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ²Institute for Global Health (ISGlobal), Hospital Clinic – Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; ³Department of Medical Microbiology, Vaccine & Infectious Disease Institute, University of Antwerp, Antwerp, Belgium; ⁴Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospital Universitario Virgen Macarena/Departamento de Medicina, Universidad de Sevilla/Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Sevilla, Spain; ⁵Laboratory of Medical Microbiology, University Hospital Antwerp, Antwerp, Belgium

*Corresponding author. E-mail: jvila@clinic.cat
†These authors contributed equally to this study.

Received 6 August 2019; returned 15 October 2019; revised 13 January 2020; accepted 16 January 2020

Objectives: To evaluate and compare the efficacy of real-time PCR (Xpert Carba-R) and loop-mediated isothermal amplification (Eazyplex[®] SuperBug CRE) for detecting carbapenemase carriage in Enterobacteriaceae directly from bronchoalveolar lavage (BAL).

Methods: Negative BAL samples were spiked with 21 well-characterized carbapenemase-producing Enterobacteriaceae strains to a final concentration of 10²–10⁴ cfu/mL. Xpert Carba-R (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA), which detects five targets (*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48} and *bla*_{IMP-1}), and the Eazyplex[®] SuperBug CRE system (Amplex-Diagnostics GmbH, Germany), which detects seven genes (*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-181}, *bla*_{CTXM-1} and *bla*_{CTXM-9}), were evaluated for the detection of these genes directly from BAL samples.

Results: Xpert Carba-R showed 100% agreement with carbapenemase characterization by PCR and sequencing for all final bacteria concentrations. Eazyplex[®] SuperBug CRE showed 100%, 80% and 27% agreement with PCR and sequencing when testing 10⁴, 10³ and 10² cfu/mL, respectively. False negative results for Eazyplex[®] SuperBug CRE matched the highest cycle threshold values for Xpert Carba-R. Hands-on time for both assays was about 15 min, but Eazyplex[®] SuperBug CRE results were available within 30 min, whereas Xpert Carba-R took around 50 min.

Conclusions: We here describe the successful use of two commercial diagnostic tests, Xpert Carba-R and Eazyplex[®] SuperBug CRE, to detect bacterial carbapenem resistance genes directly in lower respiratory tract samples. Our results could be used as proof-of-concept data for validation of these tests for this indication.

Introduction

Ventilator-associated pneumonia (VAP), the hospital-acquired pneumonia that develops in patients with tracheal intubation or on mechanical ventilation for at least 48 h, is one of the leading causes of infection and death in the healthcare setting. Patients with VAP experience longer periods with mechanical ventilation, as well as longer stays in the ICU and in the hospital.¹

Unfortunately, the diagnosis of VAP is complicated and there is no reliable reference test.² Microbiological diagnosis is necessary to confirm the clinical suspicion of VAP, but it is not without

limitations (negative culture due to empirical treatment, expensive molecular tests, difficulty in differentiating colonization from infection). Early and adequate treatment decreases the mortality,³ but empirical treatment is usually initiated in patients with suspected VAP before having a definitive diagnosis,⁴ which could cause unnecessary healthcare costs and risk of antibiotic resistance appearance.

Enterobacteriaceae, such as *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, are among the most frequent pathogens causing VAP.⁵ These microorganisms are also in the WHO priority

pathogens list due to carbapenem and third-generation cephalosporin resistance.⁶

The application of rapid diagnostic techniques to identify microbial pathogens seems to have a huge impact in the management of patients with VAP, reducing inappropriate or unnecessary antimicrobial treatments and mortality in these patients.⁷⁻⁹

Xpert Carba-R (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) is an integrated commercial technique (sample extraction, amplification by PCR and detection carried out within a self-contained cartridge) that detects five targets for carbapenemase-producing organisms (*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48} and *bla*_{IMP-1}). On the other hand, the Eazyplex[®] SuperBug CRE system (Amplex-Diagnostics GmbH, Germany) combines loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of the target and real-time photometric detection of amplified material for rapid and simple detection of ESBL- and carbapenemase-encoding genes (*bla*_{CTXM-1}, *bla*_{CTXM-9}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48} and *bla*_{OXA-181}).

The aim of this study was to evaluate and compare the efficacy of Xpert Carba-R and Eazyplex[®] SuperBug CRE for detecting ESBL and carbapenemase carriage directly from bronchoalveolar lavage (BAL) samples inoculated with a well-defined collection of Enterobacteriaceae clinical isolates.

Materials and methods

Bacterial isolates and samples

Twenty-one Enterobacteriaceae strains producing the following carbapenemases were included: four strains producing NDM, five strains producing OXA-48, one strain producing both NDM and OXA-48, one strain producing OXA-181, five strains producing KPC and five strains producing VIM (Table 1). Some of the strains were also carrying ESBLs (CTXM-1 or CTXM-9). These organisms were identified using MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The presence of genes encoding carbapenemases and ESBLs (*bla*_{CTXM-1}, *bla*_{CTXM-9}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{IMP-1} and *bla*_{OXA-181}) was confirmed by PCR amplification with specific primers and Sanger DNA sequencing.¹⁰ Negative BAL samples by bacterial culture were collected from the Clinical Microbiology Laboratory at the Hospital Clinic of Barcelona (Spain) after being processed for routine techniques. They were mixed to obtain a homogeneous matrix and stored at -80°C until use. Negative samples were homogenized by vortexing and spiked with a dilution of each of the selected strains to a final concentration of 10²-10⁴ cfu/mL. Two protocols depending on the method used are described in Figure 1.

Sample preparation for Xpert Carba-R

Spiked samples (850 µL) were mixed with sample reagent of the Xpert Carba-R assay (volume/volume), vortexed and incubated at room temperature for 10 min, vortexing every 5 min. Then, 1.7 mL of the sample reagent

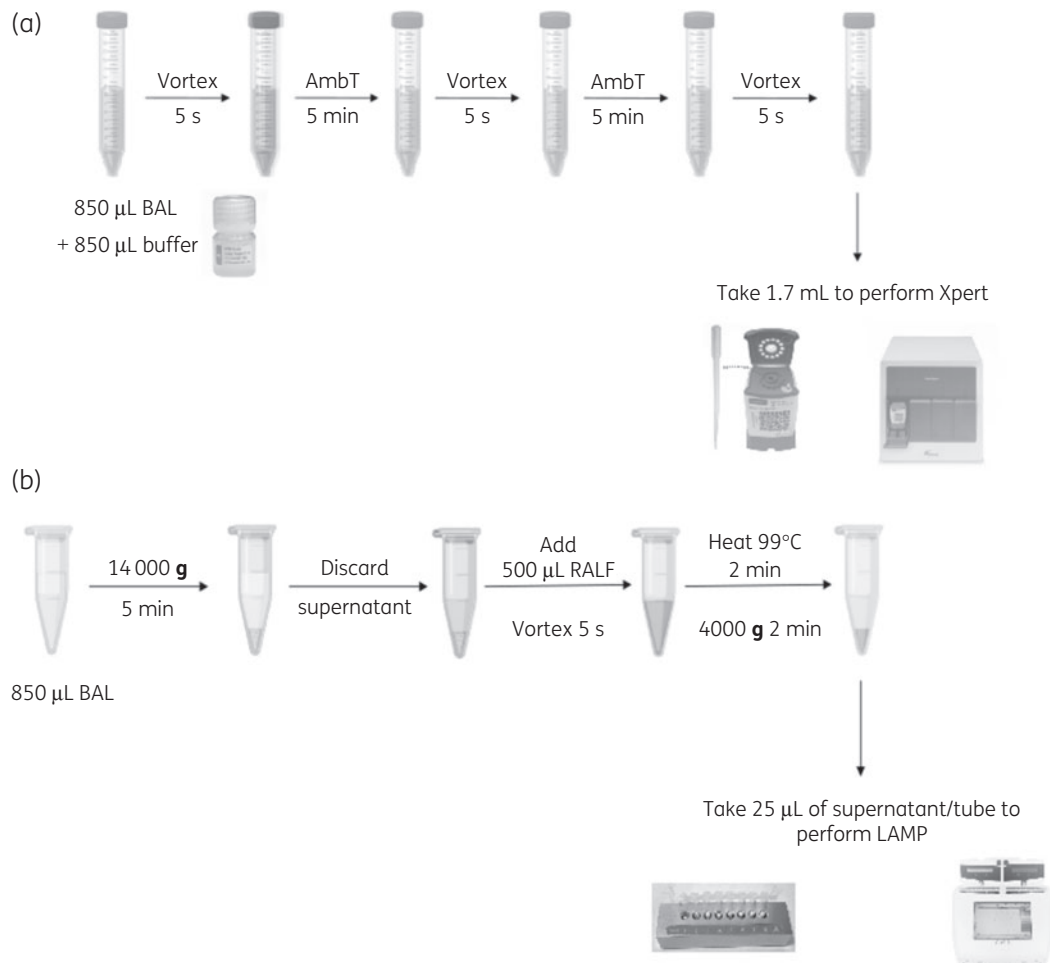


Figure 1. Sample preparation workflow for Xpert Carba-R (a) and Eazyplex[®] SuperBug CRE (b). AmbT, ambient temperature.

Table 1. Results of Xpert Carba-R and Eazyplex® SuperBug CRE for each strain and concentration expressed in Ct values and time, respectively

Bacterial species	Resistance mechanism	Concentration (cfu/mL)	Xpert Carba-R (target Ct)	Eazyplex® SuperBug CRE (target min:s)
<i>K. pneumoniae</i> 16-516	NDM, CTXM-1	10 ⁴	NDM 26.3	NDM 9:45; CTXM-1 10:00
		10 ³	NDM 28.4	NDM 14:15; CTXM-1 15:30
		10 ²	NDM 29.3	NDM NEG; CTXM-1 NEG
<i>K. pneumoniae</i> 16-377	NDM, CTXM-1	10 ⁴	NDM 26.6	NDM 11:45; CTXM-1 10:15
		10 ³	NDM 30.5	NDM 17:00; CTXM-1 13:30
		10 ²	NDM 35.4	NDM NEG; CTXM-1 16:30
<i>E. coli</i> DVR22	NDM, CTXM-1	10 ⁴	NDM 24.2	NDM 8:30; CTXM-1 10:00
		10 ³	NDM 27.5	NDM 13:30; CTXM-1 11:00
		10 ²	NDM 30.5	NDM NEG; CTXM-1 22:15
<i>E. coli</i> 16-543	NDM, CTXM1	10 ⁴	NDM 25.7	NDM 8:15; CTXM-1 6:00
		10 ³	NDM 27.2	NDM 9:30; CTXM-1 8:30
		10 ²	NDM 30.6	NDM 15:15; CTXM-1 10:00
<i>K. pneumoniae</i> HR4	NDM, OXA-48, CTXM1	10 ⁴	NDM 27.0; OXA-48 26.7	NDM 12:00; OXA-48 17:15; CTXM-1 11:45
		10 ³	NDM 31.4; OXA-48 31.2	NDM NEG; OXA-48 NEG; CTXM-1 12:00
		10 ²	NDM 33.4; OXA-48 33.4	NDM NEG; OXA-48 NEG; CTXM-1 19:00
<i>K. pneumoniae</i> 16-420	OXA-48	10 ⁴	OXA-48 28.2	OXA-48 11:30
		10 ³	OXA-48 29.8	OXA-48 18:00
		10 ²	OXA-48 30.4	NEG
<i>K. pneumoniae</i> 45-425	OXA-48, CTXM1	10 ⁴	OXA-48 26.3	OXA-48 10:45; CTXM1 9:45
		10 ³	OXA-48 30.5	OXA-48 13:15; CTXM1 11:30
		10 ²	OXA-48 33.1	NEG
<i>E. coli</i> 16-476	OXA-48	10 ⁴	OXA-48 27.0	OXA-48 12:30
		10 ³	OXA-48 28.3	OXA-48 20:00
		10 ²	OXA-48 31.3	NEG
<i>K. pneumoniae</i> 66134	OXA-48, CTXM1	10 ⁴	OXA-48 29.7	OXA-48 13:30; CTXM1 10:30
		10 ³	OXA-48 31.7	OXA-48 17:00; CTXM1 13:30
		10 ²	OXA-48 35.3	OXA-48 NEG; CTXM1 NEG
<i>E. coli</i> 65273	OXA-48	10 ⁴	OXA-48 29.4	OXA-48 13:45
		10 ³	OXA-48 29.9	OXA-48 14:30
		10 ²	OXA-48 30.3	OXA-48 NEG
<i>E. coli</i> 15-288	OXA-181, CTXM1	10 ⁴	OXA-48 28.0	OXA-181 14:15; CTXM1 12:00
		10 ³	OXA-48 31.0	OXA-181 23:30; CTXM1 NEG
		10 ²	OXA-48 33.4	OXA-181 NEG; CTXM1 NEG
<i>K. pneumoniae</i> MB545	KPC	10 ⁴	KPC 28.3	KPC 19:30
		10 ³	KPC 31.1	NEG
		10 ²	KPC 35.3	NEG
<i>K. pneumoniae</i> 45872	KPC	10 ⁴	KPC 28.5	KPC 17:15
		10 ³	KPC 32.6	KPC 21:00
		10 ²	KPC 35.9	NEG
<i>E. coli</i> 182046440	KPC	10 ⁴	KPC 28.6	KPC 16:45
		10 ³	KPC 31.2	KPC 22:50
		10 ²	KPC 35.5	NEG
<i>Enterobacter asburiae</i>	KPC, CTXM1	10 ⁴	KPC 28.6	KPC 18:15; CTXM-1 13:15
		10 ³	KPC 30.4	KPC 18:45; CTXM-1 14:00
		10 ²	KPC 33.1	KPC NEG; CTXM-1 NEG
<i>K. pneumoniae</i> 19-684	KPC, CTXM1	10 ⁴	KPC 28.1	KPC 16:00; CTXM-1 11:00
		10 ³	KPC 31.0	KPC 21:00; CTXM-1 11:45
		10 ²	KPC 34.8	KPC NEG; CTXM-1 NEG
<i>K. pneumoniae</i> 18-87	VIM	10 ⁴	VIM 22.3	VIM 13:00
		10 ³	VIM 28.3	VIM 19:45
		10 ²	VIM 31.1	NEG

Continued

Table 1. Continued

Bacterial species	Resistance mechanism	Concentration (cfu/mL)	Xpert Carba-R (target Ct)	Eazyplex [®] SuperBug CRE (target min:s)
<i>E. coli</i> 18-38	VIM	10 ⁴	VIM 24.1	VIM 9:30
		10 ³	VIM 26.7	VIM 12:15
		10 ²	VIM 30.6	VIM 19:45
<i>K. pneumoniae</i> MC-32-145	VIM	10 ⁴	VIM 25.1	VIM 15:30
		10 ³	VIM 28.9	VIM 18:00
		10 ²	VIM 31.3	VIM 19:30
<i>Enterobacter cloacae</i> MC-13-3	VIM, CTXM9	10 ⁴	VIM 27.2	VIM 12:15; CTXM9 14:15
		10 ³	VIM 32.5	VIM 16:15; CTXM9 18:30
		10 ²	VIM 36.7	VIM NEG; CTXM9 19:45
<i>E. coli</i> MC-4-19	VIM, CTXM9	10 ⁴	VIM 25.8	VIM 12:45; CTXM9 17:30
		10 ³	VIM 29.9	VIM 18:20; CTXM9 18:15
		10 ²	VIM 36.8	VIM NEG; CTXM9 NEG

NEG, negative.

was transferred into the cartridge and the assay was run on the GeneXpert platform (Cepheid) according to the manufacturer's instructions.

Sample preparation for Eazyplex[®] SuperBug CRE

The same volume of spiked sample (850 µL) was centrifuged at 14 000 g for 5 min, and the pellet was resuspended in 500 µL of resuspension and lysis fluid (RALF) and incubated in a thermal block (99°C) for 2 min. After centrifugation, 25 µL of the supernatant was added to each tube of the strip containing the ready-to-use master mix. The strip was immediately placed into the Genie II instrument (OptiGene, Horsham, UK). The reaction mixtures were incubated at 66°C for 30 min with fluorescence monitoring. The Eazyplex[®] SuperBug CRE test strip contains eight wells with six oligonucleotide primers in each well, allowing the simultaneous specific amplification of seven different resistance genes, plus an internal control.

Analysis

We evaluated the agreement between the results obtained by conventional methods and the rapid test applied directly to the clinical sample. Time to obtain the results and agreement were compared between Xpert Carba-R and Eazyplex[®] SuperBug CRE. Statistical analysis was performed with the software R (version 3.4.4).

Results and discussion

Considering Xpert Carba-R, 100% agreement with PCR and sequencing was observed with all concentrations (Table 1). Regarding Eazyplex[®] SuperBug CRE, the concordance was 100%, 80% and 27% when testing 10⁴, 10³ and 10² cfu/mL, respectively. False negative results for Eazyplex[®] SuperBug CRE matched the highest cycle threshold (Ct) values for Xpert Carba-R (median Ct of 33.2 and 28.3 for negative and positive Eazyplex[®] SuperBug CRE results, respectively; $P < 0.001$). At 10² cfu/mL, most of the genes were not detected, in contrast to Xpert Carba-R. This is an integrated assay that includes a DNA extraction step, which increases the amount of DNA for the amplification step compared with the LAMP assay.

Hands-on time for both assays was about 15 min, but with easier-to-use sample preparation for Xpert Carba-R. Regarding

time to results, Eazyplex[®] SuperBug CRE results were available within 30 min, whereas Xpert Carba-R took around 50 min.

In order to distinguish between infection and colonization, it is established that a concentration of microorganisms in BAL $\geq 10^4$ cfu/mL is indicative of infection,¹¹ although several factors can modify this interpretation. In a previous study evaluating Xpert Carba-R on BAL samples, a cut-off value to distinguish between infection (Ct ≤ 24.7 corresponded to a count of $\geq 10^5$ cfu/mL) and colonization (Ct > 26.9 corresponded to a count of $< 10^4$ cfu/mL) was proposed.¹² Although we observed a good correlation between the Ct value for Xpert Carba-R and the bacterial concentration ($r = -0.81$, $P < 0.001$), due to the limited number of samples we could not establish such a cut-off. This was not observed for the Eazyplex[®] SuperBug CRE results ($r = 0.45$, $P < 0.001$). Although both assays were able to detect the target genes at bacterial concentrations below the diagnostic limit for infection in BAL, Xpert Carba-R showed a limit of detection 10-fold lower than that of Eazyplex[®] SuperBug CRE.

We here describe the successful use of two commercial diagnostic tests to detect bacterial carbapenem resistance genes directly in lower respiratory tract samples: Xpert Carba-R, which is designed to identify patients showing gastrointestinal colonization with carbapenemase-producing organisms, and Eazyplex[®] SuperBug CRE, which is designed to detect carbapenemases and ESBLs from bacterial strains or directly from positive blood culture. Our results could be used as proof of concept for the development of studies with larger sample sizes to validate these tests for this indication.

Acknowledgements

We want to thank Dr Luis Martínez-Martínez for providing us with some strains.

Funding

This work was supported by Ajut a la Recerca 'Clínic-LaPedrera' 2016 (PEP: HB-16-JF-VG-C) and grant 2014SGR0653 from the Departament de Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de

Catalunya; by Plan Nacional de I + D+i 2013–2016, Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD16/0016/0010) and the 2017 call for Strategic Action on Health (PI17/01932) and (PI17/01468), co-financed by European Development Regional Fund 'A way to achieve Europe' and operative programme Intelligent Growth 2014–2020; and by the Innovative Medicines Initiative (Combacte-Care, grant agreement 115620). I.R. was supported by the Department of Health, Generalitat de Catalunya, grant SLT002/16/00349.

Transparency declarations

None to declare.

References

- 1 Kollef MH. What is ventilator-associated pneumonia and why is it important? *Respir Care* 2005; **50**: 714–21.
- 2 Klompas M. Does this patient have ventilator-associated pneumonia? *JAMA* 2007; **297**: 1583–93.
- 3 Herkel T, Uvizl R, Doubravska L *et al*. Epidemiology of hospital-acquired pneumonia: results of a Central European multicenter, prospective, observational study compared with data from the European region. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2016; **160**: 448–55.
- 4 Kalanuria AA, Zai W, Mirski M. Ventilator-associated pneumonia in the ICU. *Crit Care* 2014; **18**: 208.
- 5 Vila Estapé J, Zboromyrska Y, Vergara Gómez A *et al*. Métodos moleculares de diagnóstico de infecciones respiratorias. ¿Ha cambiado el esquema diagnóstico? *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2016; **34**: 40–6.
- 6 Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A *et al*. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 2018; **18**: 318–27.
- 7 Roberts KL, Micek ST, Juang P *et al*. Controversies and advances in the management of ventilator associated pneumonia. *Expert Rev Respir Med* 2017; **11**: 875–84.
- 8 Millot G, Voisin B, Loiez C *et al*. The next generation of rapid point-of-care testing identification tools for ventilator-associated pneumonia. *Ann Transl Med* 2017; **5**: 451.
- 9 Vergara A, Boutal H, Ceccato A *et al*. Assessment of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid detection of pathogenic bacteria from respiratory samples in patients with hospital-acquired pneumonia. *Microorganisms* 2020; **8**: 103.
- 10 Solé M, Pitart C, Roca I *et al*. First description of an *Escherichia coli* strain producing NDM-1 carbapenemase in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 4402–4.
- 11 Chastre J, Trouillet J-L, Combes A *et al*. Diagnostic techniques and procedures for establishing the microbial etiology of ventilator-associated pneumonia for clinical trials: the pros for quantitative cultures. *Clin Infect Dis* 2010; **51**: 88–92.
- 12 Burillo A, Marín M, Cercenado E *et al*. Evaluation of the Xpert Carba-R (Cepheid) assay using contrived bronchial specimens from patients with suspicion of ventilator-associated pneumonia for the detection of prevalent carbapenemases. *PLoS One* 2016; **11**: e0168473.

Evaluación de la LCN2 como biomarcador de neumonía.

Resultados adicionales 2.

Vergara A, Casals-Pascual C, Motos A, Fernández-Barat L, Torres A, Vila J. Evaluación de la lipocalina-2 como biomarcador de neumonía asociada a ventilación mecánica en un modelo animal. XXIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Madrid 2019.

Hipótesis

La NAVM es una de las principales causas de infección en pacientes en la UCI, con una alta morbi-mortalidad. El tratamiento adecuado y precoz es crucial, pero el diagnóstico es difícil. El uso de biomarcadores puede ayudar en el diagnóstico y tratamiento precoz de estos pacientes. La LCN2, proteína bien caracterizada producida por neutrófilos, ha demostrado ser un buen biomarcador de NAC.

Objetivos

Evaluar la utilidad de la LCN2 en plasma y LBA para el diagnóstico de la NAVM en un modelo porcino.

Material y métodos

Se intubaron diez cerdos sanos colocados en posición *anti-Trendelenburg* y se ventilaron mecánicamente durante 72 h, siguiendo un modelo de NAVM previamente validado (252) (**Figura 9**). A cuatro animales se les instiló, con un intervalo de cuatro horas, dos

Resultados

suspensiones de *P. aeruginosa* en la orofaringe, a otros cuatro animales *S. aureus*, mientras que dos animales no recibieron inóculo bacteriano. Se cultivaron las muestras respiratorias y se registró la mecánica respiratoria. En la autopsia, se obtuvieron muestras lobares para corroborar la NAVM a través de estudios microbiológicos e histológicos. La concentración de LCN2 se determinó en plasma y LBA a tiempo cero y a las 24, 48 y 72 horas tras la inoculación bacteriana mediante una técnica ELISA (Pig NGAL ELISA Kit, BioPorto Diagnostics). Se compararon las medianas de concentración de LCN2 entre cada grupo y también entre cada tiempo de recogida de la muestra dentro de cada grupo. Se realizó un ANOVA de medidas repetidas o una prueba T para muestras relacionadas (software R version 3.4.4).

Figura 9. Posición del animal en el modelo de neumonía asociada a ventilación mecánica en cerdos. Los cerdos se colocaron en posición prona y la cama quirúrgica hecha a medida se orientó aproximadamente 30 grados en la posición anti-Trendelenburg para lograr una orientación del sistema respiratorio como en la posición semisentada en los seres humanos. Copiado de la referencia (252) con permiso de los autores; copyright 2021, American Society of Anesthesiology.



Resultados

Se obtuvieron un total de 64 muestras: 8 muestras de plasma y 8 LBA del grupo control (N=2); 16 muestras de plasma y 16 LBA del grupo infectado por *P. aeruginosa* (N=4); y 8 muestras de plasma y 8 LBA del grupo infectado por *S. aureus* (N=4). En la **Tabla 7** se recogen las medianas (RIQ) de concentración de LCN2. Los niveles de LCN2 en LBA fueron más bajos que en plasma. Se observó un aumento progresivo de la concentración de LCN2 en los animales con infección por *S. aureus* y *P. aeruginosa* en plasma y LBA, aunque sólo fue estadísticamente significativo para el grupo de infección por *S. aureus*. Esta tendencia no se observaba en el grupo control.

Tabla 7. Concentración de lipocalina-2 [mediana (RIQ)] en los distintos grupos y tiempos de recogida de muestras.

	CONTROL		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	Plasma	LBA	Plasma	LBA	Plasma	LBA
Basal	1126 (1123-1130)	629 (627-632)	983 (947-1046)	292 (48-677)	977 ^A (931-1058)	138 ^B (88-253)
24 horas	1447 (1379-1514)	937 (875-1000)	1120 (1086-1148)	601 (236-910)	1472 ^A (1435-1502)	995 ^B (890-1097)
48 horas	1420 (1415-1425)	503 (290-715)	1242 (1003-1497)	820 (673-979)	-*	-
72 horas	1094 (1040-1150)	1380 (1327-1433)	1220 (1175-1357)	3860 (1055-6618)	-	-

*En el grupo con *S. aureus* sólo se dispone de muestras basales y 24 horas.

^{A,B} $p < 0.05$

Resultados

Conclusiones

La LCN2 podría ser un potencial biomarcador de NAVM, ya que a pesar del número bajo de muestras, se han obtenido resultados prometedores. Serían necesarios estudios con mayor tamaño muestral y en pacientes para corroborar estos resultados del modelo animal.

Resultados adicionales 3.

Vergara A*, Boix L*, Padilla E, Martínez D, Calbo E, Blanco A, Pérez J, Vila J, Casals-Pascual C. Evaluation of Plasma Lipocalin-2 as a Predictor for Etiology, Severity and Prognosis of Adult Patients with Community-Acquired Pneumonia. Manuscrito en preparación. *Coautoras

Hipótesis

La NAC es una infección del tracto respiratorio inferior con una alta morbilidad y mortalidad asociadas en todo el mundo. La identificación y validación de nuevos biomarcadores para mejorar el diagnóstico de la NAC es un área de investigación emergente y prometedora. En esta línea, la concentración plasmática de LCN2 se presenta como un potencial biomarcador de gravedad y pronóstico de la NAC, aunque su papel para predecir la etiología es controvertido.

Objetivos

Evaluar la utilidad de la concentración plasmática de LCN2 para determinar la etiología (bacteriana frente a no bacteriana), gravedad y pronóstico (admisión en UCI) de pacientes adultos con NAC admitidos en Urgencias.

Material y métodos

Estudio prospectivo observacional en el que se incluyeron pacientes adultos con NAC que acudieron a Urgencias. Se recogieron variables demográficas, clínicas y de laboratorio. La concentración plasmática de LCN2 se midió al ingreso mediante un inmunoensayo enzimático modificado acoplado con quimioluminiscencia (Architect, Abbott Laboratories).

Resultados

Resultados

Se incluyeron un total de 130 pacientes con NAC: 71 (54,6%) NAC bacteriana, 42 (32,3%) NAC no filiada; y 17 (13,1%) NAC viral. La concentración de LCN2 fue significativamente mayor en el grupo de NAC bacteriana (122.0 vs 89.7 ng / mL, respectivamente) ($p = 0.03$), al igual que ocurrió con la CRP. Respecto a la severidad, la concentración media de LCN2 fue significativamente mayor en el grupo de alto riesgo (88,2 ng/ml y 90,9 ng/ml en el grupo de bajo riesgo, 115,0 ng/mL y 107,4 ng/mL en el grupo de riesgo intermedio, y 265,0 ng/ml y 265,0 ng/ml en el grupo de alto riesgo; utilizando la clasificación CURB-65 y PSI, respectivamente), mientras que la CRP, el recuento de leucocitos y el recuento de linfocitos no difirieron significativamente entre los tres grupos. La concentración plasmática de LCN2 al ingreso fue mayor en los pacientes ingresados en la UCI (246.7 ng/mL vs. 98.4 ng/mL), diferencia que no se encontró al analizar otros biomarcadores.

Conclusiones

La capacidad de la concentración plasmática de LCN2 como biomarcador para discriminar la etiología de la NAC es limitada. Sin embargo, la concentración de LCN2 se asoció con la gravedad y el ingreso en la UCI en pacientes adultos con NAC.

**Evaluation of Plasma Lipocalin-2 as a Predictor for Etiology, Severity and Prognosis of
Adult Patients with Community-Acquired Pneumonia**

Andrea Vergara^{1,2,3,#,*}, Lucía Boix-Palop^{2,4,*}, Emma Padilla⁵, Diego Martínez¹, Esther Calbo⁴, Ana Blanco⁵, Josefa Pérez⁵, Jordi Vila^{1,2,3}, Climent Casals-Pascual^{1,2,3}

¹ Department of Clinical Microbiology, Biomedical Diagnostic Center (CDB), Hospital Clinic of Barcelona

² School of Medicine, University of Barcelona, Barcelona

³ Instituto de Salud Global (ISGlobal), Barcelona

⁴ Hospital Universitari Mútua de Terrassa, Terrassa, Barcelona

⁵ Catlab, Viladecavalls, Barcelona

Corresponding author: Andrea Vergara, Department of Clinical Microbiology, Hospital Clinic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. Tel. +34932275522; e-mail: vergara@clinic.cat

* These authors contributed equally to this work.

Abstract

Introduction

Community-acquired pneumonia (CAP) is a lower respiratory tract infection with high associated morbidity and mortality worldwide. The identification and validation of new biomarkers to improve CAP diagnosis is an emerging and promising area of research. Plasma concentration of lipocalin-2 (LCN2) is a potential biomarker of CAP severity and prognosis, although its role in predicting the etiology is controversial. The aim of this study was to evaluate the utility of plasma LCN2 concentration in adult patients with CAP admitted to the Emergency Department to determine the etiology (bacterial vs. non-bacterial), severity and prognosis by predicting Intensive Care Unit (ICU) admission.

Methods

Prospective observational study in which adult patients with CAP attending the Emergency Department were included. Demographic, clinical and laboratory variables were collected. Plasma LCN2 concentration was measured on admission by a modified enzyme immunoassay coupled with chemiluminescence (Architect, Abbott Laboratories).

Results

A total of 130 patients with CAP were included: 71 (54.6%) bacterial CAP, 42 (32.3%) non-filiated CAP; and 17 (13.1%) viral CAP. LCN2 concentration was significantly higher in the bacterial CAP group (122.0 vs 89.7 ng/mL, respectively) ($p = 0.03$). Similar results were found for C-reactive protein (CRP). Regarding severity, the

mean concentration of LCN2 was significantly higher in the high-risk group (88.2 ng/mL and 90.9 ng/mL in the low-risk group, 115.0 ng/ml and 107.4 ng/mL in the intermediate-risk group, and 265.0 ng/mL and 265.0 ng/mL in the high-risk group; using the CURB-65 and PSI classification, respectively), while CRP, white blood cell (WBC) count and lymphocyte count did not differ significantly between the three groups. Plasma concentration of LCN2 at admission was higher in patients admitted to the ICU (246.7 ng/mL vs. 98.4 ng/mL), a difference that was not found when analyzing other biomarkers.

Conclusions

The utility of plasma LCN2 concentration as a biomarker to discriminate the etiology of CAP is limited. However, LCN2 concentration was associated with severity and ICU admission in adult patients with CAP.

Introduction

Community-acquired pneumonia (CAP) is a lower respiratory tract infection with a high associated morbidity and mortality worldwide (1). In clinical practice, it is not uncommon that the typical symptoms associated with pneumonia, namely cough, sputum production, dyspnea, fever and pleuritic chest pain, are not present, particularly in elderly patients or patients with comorbidities (2). Approximately 10% of hospitalized patients with CAP require admission to the intensive care unit (ICU) and a significant proportion of patients discharged from the hospital are readmitted within one month (3). Early diagnosis and treatment of CAP is crucial for the correct clinical management, as severe CAP can be life-threatening. Furthermore, the differentiation between viral and bacterial CAP is essential for the rational administration of antibiotics, de-escalation of empirically administered antibiotics and, ultimately, reduction in the appearance of antibiotic resistance.

Biomarkers are characteristics that can be objectively measured and used as indicators of normal biological processes, pathogenic processes, or pharmacological responses to a therapeutic intervention (4). The identification and validation of novel biomarkers to improve the diagnosis of CAP is an emerging and promising area of research in infectious diseases. Traditional biomarkers such as white blood cell (WBC) count and erythrocyte sedimentation rate have poor sensitivity and specificity compared to C-reactive protein (CRP) and procalcitonin (5), although the last two biomarkers have limited specificity (6). Other inflammatory mediators, such as interleukin (IL) -1 β , IL-6, tumor necrosis factor (TNF) - α , and IL-8 have also been found to be elevated in response to infection. However, these pro-inflammatory cytokines

have very short half-lives and low specificity, presenting a limited diagnostic performance (5).

New biomarkers have been tested for different purposes: to distinguish between pneumonia of viral and bacterial etiology (7), to distinguish between severe and non-severe CAP (3,8,9) and to detect treatment failure (3).

Lipocalin-2 (LCN2), also known as neutrophil gelatinase-associated lipocalin, is a member of the lipocalin family of binding proteins, a large group of small extracellular proteins (10,11). LCN2 participates in the innate immune response using an iron-depletion strategy (10,12). It prevents iron acquisition by microorganisms by sequestering iron-loaded bacterial siderophores, thus limiting their growth. LCN2 is constitutively present in neutrophils as well as in many other tissues, such as colon, uterus, trachea, lung, stomach, prostate and salivary gland (13). Its concentration increases in kidney tubular cells, intestinal epithelial cells, stomach cells and hepatic cells in response to a variety of stimuli, which include infection or ischemia (12). Xu *et al* demonstrated that serum LCN2 discriminates between viral and bacterial infections with a higher sensitivity and specificity than CRP in patients with acute infections (14).

Several studies found that plasma LCN2 concentration is a valuable biological marker in the assessment of the severity and prediction of the prognosis of patients with CAP (7,15–19). The capacity of LCN2 levels to define etiology of CAP remains controversial (7,20).

The aim of this study was to evaluate the utility of plasma LCN2 concentration to determine the etiology (bacterial vs. non-bacterial), severity and prognosis by predicting UCI admission of adult patients with CAP in the Emergency Department.

Methods

Study design

Prospective observational cohort study carried out in a 400-bed teaching hospital in Barcelona, Spain. Consecutive adult patients with CAP admitted to the hospital through the Emergency Department (ED) from November 2015 to May 2017 were included.

CAP was defined as an acute illness (symptoms lasting for ≤ 7 days) with the presence of a new infiltrate on a chest radiography associated with two or more of the following signs and symptoms: fever or hypothermia, dyspnoea, cough, sputum production, pleuritic chest pain, altered breath sounds on auscultation. The exclusion criteria were: age < 18 years, nosocomial or bronchoaspiratory pneumonia, antibiotic treatment started at the ED > 4 h before the potential inclusion in the study, hospital admission during the previous 14 days or previous inclusion in the study.

The study was conducted in accordance with the latest version of the Declaration of Helsinki and was approved by the hospital Ethics and Research Committee. Written informed consent obtained within 72 hours after admission was required for data collection.

Evaluation at admission and follow up

Demographic and clinical variables were prospectively collected as described in supplementary material. At the inclusion visit, before starting antibiotic therapy, laboratory tests, arterial blood gas sampling and chest radiography were performed (see supplementary material for details). The pneumonia severity index (PSI) (21) and

the CURB-65 (confusion, urea, respiration, blood pressure, age \geq 65 years) score (22) were used to grade the severity of the CAP. Patients were seen daily during their hospital stay by one of the investigators. Appropriate diagnostic tests based on epidemiology, clinical characteristics and the patient's clinical course were performed. Patients were followed up during 30 days after discharge.

LCN2 quantification

Plasma LCN2 concentration was determined at admission using a modified enzyme immunoassay coupled with chemiluminescence (Architect Urine NGAL; Abbott Laboratories) and the ARCHITECT *i*1000SR equipment (Abbott Laboratories, Madrid, Spain) following manufacturer's instructions. The assay includes a microparticle reagent prepared by covalently attaching an anti-LCN2 antibody to paramagnetic particles and a conjugate reagent prepared by labeling a second anti-LCN2 antibody with acridinium. The assay is completely automated and it allows to analyze individual or sets of samples.

Statistical analysis

Categorical variables were presented using counts and percentages and continuous variables as medians and interquartile range (IQR). Comparative analyses were performed with the Fisher exact test for categorical variables and Mann-Whitney test for continuous variables. Relationship between continuous variables was evaluated with Spearman correlation coefficient.

The receiver operating characteristic (ROC) curve was used to determine the optimal cut-off value of plasma LCN2 concentration to diagnose bacterial CAP.

Multivariate logistic regression was performed to study the independent contribution of each variable to the dependent variable.

Differences were considered statistically significant at the two-sided $p < 0.05$ level. Statistical analyses were performed using the R Statistical Software (version 4.0.3) and RStudio Software (version 1.3.1093).

Results

Etiology and patients characteristics

A total of 130 patients with CAP were included in the study: 71 (54.6%) bacterial CAP (including co-infections with other bacteria or virus), 42 (32.3%) non-filiated CAP; and 17 (13.1%) viral CAP (including co-infections with other respiratory virus). Among bacterial CAP, 83.3% (60/71) of the cases were pneumococcal CAP, with viral co-infection in 28 cases and bacterial co-infection in 2 cases. Figure 1 shows the CAP etiology in detail. Patient characteristics and comparison among bacterial, non-filiated and viral CAP are shown in Table 1.

Plasma LCN2 and CAP etiology

Plasma LCN2 concentration was higher in bacterial CAP group (122.0 ng/mL), followed by viral CAP (112.3 ng/mL) and non-filiated CAP (88.2 ng/mL), without reaching statistical significance ($p = 0.09$) (Fig2). By grouping non-filiated and viral CAP, concentration of LCN2 is significantly higher in the bacterial CAP group (122.0 vs. 89.7 ng/mL, respectively) ($p = 0.03$) (Fig2). The optimal cut-off value for maximal sensitivity (78.0%) and specificity (47.9%) to discriminate bacterial CAP versus non-bacterial CAP was 138.9 ng/mL, which produced an AUROC of 0.62 (95% CI 0.52-0.72).

Plasma CRP at admission was significantly higher in bacterial CAP [253.0 mg/L (79.0-360.7)] compared to non-filiated [147.0 mg/L (48.5-276.5)] and viral CAP [89.5 mg/L (43.5-140.0)] ($p = 0.001$) (Fig2). Difference between non-filiated and viral CAP did not reach statistical significance. By grouping non-filiated and viral CAP, concentration

of CRP was significantly higher in the bacterial CAP group [253.0 mg/L (78.9-360.7) vs. 130.0 mg/L (43.7-237.0), respectively) ($p < 0.001$) (Fig2).

Regarding WBC count at admission, it was higher in bacterial CAP [$13.5 \times 10^9/L$ (9.7-19.3)], followed by non-filiated [$12.8 \times 10^9/L$ (10.4-16.8)] and viral [$10.3 \times 10^9/L$ (6.6-14.0)] CAP, without reaching statistical significance ($p = 0.08$) (Fig2). When grouping non-filiated and viral CAP, WBC count was slightly higher in the bacterial CAP group [$13.5 \times 10^9/L$ (9.7-19.3) vs. $11.9 \times 10^9/L$ (8.1-16.0)], respectively) ($p = 0.2$) (Fig2).

As for the lymphocytes count at admission, no significant differences were found among groups [$1.0 \times 10^9/L$ (0.7-1.4) for bacterial CAP, $1.2 \times 10^9/L$ (0.8-1.6) for non-filiated CAP and $1.2 \times 10^9/L$ (0.7-1.7) for viral CAP, $p = 0.4$; $1.0 \times 10^9/L$ (0.7-1.4) for bacterial CAP and $1.2 \times 10^9/L$ (0.7-1.6) for non-bacterial CAP, $p = 0.2$] (Fig2).

A positive weak correlation was found between plasma LCN2 at admission and CRP at admission ($R = 0.31$, $p < 0.01$) and WBC count at admission ($R = 0.31$, $p < 0.01$) (sFig1).

A comparison was made among the paired ROC curves of LCN2, CRP and WBC and showed the differences not to be statistically significant. However, the performance was better for LCN2 and CRP compared to WBC (sFig2). The combination of LCN2 and CRP or LCN2 and WBC count slightly improve the AUC of LCN2 alone for the discrimination of a bacterial CAP (sFig3).

Regarding pneumococcal pneumonia (N=60), plasma LCN2 concentration was significantly higher in those patients with positive blood culture compared to those with negative ones [285.6 ng/mL (122.0-393.6) vs. 94.1 ng/mL (57.2-166.6),

respectively; $p = 0.005$] and in those patients with positive *lytA* PCR in blood compared to those with negative PCR [273.9 ng/mL (169.0-368.1) vs. 96.4 ng/mL (62.5-202.5), respectively; $p = 0.04$] (Fig3). These differences were not observed when analyzing urine antigen detection and *lytA* PCR in nasopharyngeal swab (Fig3).

Plasma LCN2 as a biomarker of severity CAP

Patients were stratified into three risk groups based on the CURB-65 score (0/1; 2; and 3) and based on the PSI (I/II/III: ≤ 90 points; IV: 90-130 points; V: ≥ 131) (Table 2). The high-risk group comprised 16.3% and 14.7% of the CAP patients according to CURB-65 and PSI, respectively. The median (IQR) concentrations of LCN2, CRP, WBC count and lymphocytes count in each CURB-65 and PSI risk group are presented in Table 2.

The CRP, WBC count and lymphocytes count did not differ significantly between the three groups, but the concentrations of LCN2 did, independently of the score. The median LCN2 concentration was 88.2 ng/mL (53.5-144.4) and 90.9 ng/mL (54.1-159.6) in the low-risk group; 115.0 ng/mL (62.0-243.1) and 107.4 ng/mL (59.9-176.5) in the intermediate-risk group; and 265.0 ng/mL (138.8-380.2) and 265.0 ng/mL (120.3-352.4) in the high-risk group using the CURB-65 and PSI classification, respectively. The median LCN2 concentration was significantly higher in the high-risk group than in the other two risk groups in both cases. We reasoned that the association of LCN2 with outcome could have been confounded by age, antibiotic intake or time from the onset of symptoms to ED admission, which could affect the kinetics of plasma LCN2. The multivariate analysis adjusting for these potential confounders showed that plasma

LCN2 was associated with severity (CURB-65 and PSI) ($p = 0.02$ and $p = 0.03$, respectively) independently of these variables.

Plasma LCN2 and clinical outcome

Plasma LCN2 concentration at ED admission was higher in patients admitted to the ICU than in patients admitted to the general ward, but did not reach statistical significance: 150.6 ng/mL (105.6-430.4) vs 98.1 ng/mL (60.3-184.6), respectively ($p = 0.06$). However, when we excluded all patients that have taken antibiotics in the last 24 hours before admission, the difference was statistically significant: 246.7 ng/mL (134.2- 548.0) vs. 98.4 ng/mL (61.5-180.2), respectively ($p = 0.03$). We did not find statically significant differences for the other biomarkers.

The AUROC of LCN2 concentration for predicting UCI admission in CAP patients (without antibiotics in the last 24 hours) was 0.72 (95% CI 0.52-0.94). The optimal LCN2 cutoff concentration was 119.5 ng/mL, with a sensitivity of 87.5% and a specificity of 59.6%. The multivariate analysis showed that plasma LCN2 was associated with ICU admission ($p = 0.02$) independently of having renal failure (condition in which LCN2 could be increased), antibiotics intake and time from symptoms to ED admission.

Discussion

The present study evaluated the association between plasma concentration of LCN2 and bacterial etiology, severity and ICU admission in 130 patients with CAP. LCN2 participates in the innate immune response by preventing iron acquisition by microorganisms, thus limiting its growth. It is constitutively present within neutrophils as well as in many other tissues. It has traditionally been used as a marker of acute kidney failure for many years (23), but it has been also proposed as a biomarker of infection (12), including CAP (7,15–19).

To reduce unnecessary antibiotic treatment, early identification of CAP etiology is critical. Previous studies showed significant higher levels of LCN2 in patients with bacterial CAP in children (24), but these findings were not confirmed by other studies (20). Xu *et al* demonstrated that serum LCN2 discriminates viral and bacterial infections with a higher sensitivity and specificity than CRP in patients, children and adults included, with acute infections (14). Similarly, Yu *et al* (25) found that measurement of LCN2 could distinguish between acute infections caused by bacteria or virus, including 110 adult patients with upper and lower respiratory tract infections. In our study, including only adult patients with CAP, LCN2 concentration was similar to CRP to predict the etiology of CAP.

Regarding pneumococcal pneumonia, here we report that LCN2 is associated with blood culture positivity, as well as with PCR positivity and bacterial load in blood. Unfortunately, this was not observed with less invasive tests, such as nasopharyngeal swab qPCR or urine antigen detection.

As reported in previous studies (18,20,24), we found a relationship between higher LCN2 concentration at ED admission and more severe CAP. We have compared two different severity indexes, PSI and CURB-65, with LCN2 concentration with similar results. We could not confirm this observation for CRP, WBC count or lymphocyte count.

The prognostic value of LCN2 has been previously evaluated. Indeed, Min *et al* (26) found that plasma LCN2 was a useful biomarker for predicting ICU admission and mortality in hospital patients with pneumonia. Similarly, we found that LCN2 concentration was significantly higher in those patients that required ICU admission. We could not analyze the usefulness of LCN2 as a biomarker of in-hospital mortality or 30-day mortality because only one patient died in the hospital and none of them during the 30 days of follow-up.

This study has limitations. Firstly, the limited number of patients and the retrospective nature of the study did not allow us to draw any conclusion about the effectiveness of using LCN2 as a biomarker for the management of CAP. Secondly, the concentration of LCN2 was measured at a single time point, which makes it impossible to evaluate the kinetics of this biomarker over the course of infection.

Perhaps the major strength of this study is that the patients included were part of a well characterized cohort. Moreover, this is the first study to our knowledge in which a chemiluminescence technique is used to evaluate the LCN2 as a biomarker of CAP. In most papers LCN2 concentration was measured with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) which is neither easy nor rapid. The assay used in the present study is completely automated, allowing individualized sample testing with

absolute quantification of LCN2 and a turnaround time of 30 minutes, making this method suitable for point-of-care use.

In conclusion, the ability of LCN2 as a biomarker to discriminate CAP etiology is limited. However, LCN2 concentration was associated with severity and ICU admission in adult patients with CAP. The technique used in this study make it possible to determine LCN2 concentration in a reasonable time to take clinical decisions. Interventional studies should be conducted to further evaluate the potential clinical and cost-effectiveness of this biomarker in CAP.

Acknowledgments

This work was supported by the Fondo de Investigación en Salud of the Instituto de Salud Carlos III, with the grant nº PI 14/01898 from the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades of Spain; the Ajut a la Recerca “Clínic-La Pedrera” 2016 (PEP:HB-16-JF-VG-C); and the Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD16/0016/0010) and was co-financed by European Development Regional Fund “A way to achieve Europe”.

References

1. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380(9859):2095–128.
2. Chalmers J. The Modern Diagnostic Approach to Community-Acquired Pneumonia in Adults. *Semin Respir Crit Care Med*. 2016;37(06):876-885.
3. Morley D, Torres A, Cillóniz C, Martin-Loeches I. Predictors of treatment failure and clinical stability in patients with community acquired pneumonia. *Ann Transl Med*. 2017;5(22):443.
4. Califf RM. Biomarker definitions and their applications. *Exp Biol Med*. 2018;243(3):213–21.
5. Shaddock EJ. How and when to use common biomarkers in community-acquired pneumonia. *Pneumonia*. 2016;8:17.
6. Karakioulaki M, Stolz D. Biomarkers in Pneumonia-Beyond Procalcitonin. *Int J Mol Sci*. 2019;20(8):2004.
7. Huang H, Ideh RC, Gitau E, Thézénas ML, Jallow M, Ebruke B, et al. Discovery and Validation of Biomarkers to Guide Clinical Management of Pneumonia in African Children. *Clin Infect Dis*. 2014;58(12):1707-1715.
8. Feldman C, Anderson R. Pneumonia as a systemic illness. *Curr Opin Pulm Med*. 2018;24(3):237-243.

9. Viasus D, Del Rio-Pertuz G, Simonetti AF, Garcia-Vidal C, Acosta-Reyes J, Garavito A, et al. Biomarkers for predicting short-term mortality in community-acquired pneumonia: A systematic review and meta-analysis. *J Infect.* 2016 Mar;72(3):273-282.
10. Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK. The Neutrophil Lipocalin NGAL Is a Bacteriostatic Agent that Interferes with Siderophore-Mediated Iron Acquisition. *Mol Cell.* 2002;10(5):1033-1043.
11. Flower DR. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J.* 1996 Aug 15;318(1):1-14.
12. Nasioudis D, Witkin SS. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and innate immune responses to bacterial infections. *Med Microbiol Immunol.* 2015;204(4):471-479.
13. Cowland JB, Borregaard N. Molecular Characterization and Pattern of Tissue Expression of the Gene for Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin from Humans. *Genomics.* 1997;45(1):17-23.
14. Xu SY, Pauksen K, Venge P. Serum measurements of human neutrophil lipocalin (HNL) discriminate between acute bacterial and viral infections. *Scand J Clin Lab Invest.* 1995;55(2):125-131.
15. Kim JW, Hong DY, Lee KR, Kim SY, Baek KJ, Park SO. Usefulness of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin concentration for predicting the severity and mortality of patients with community-acquired pneumonia. *Clin Chim Acta.* 2016;462:140-145.

16. Liu C, Wang F, Cui L, Zhou J, Xu Z. Diagnostic value of serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin, interleukin-6 and anti-citrullinated alpha-enolase peptide 1 for lower respiratory tract infections. *Clin Biochem.* 2020;75:30-34.
17. Min JH, Lee H, Chung SJ, Yeo Y, Park TS, Park DW, et al. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin for Predicting Intensive Care Unit Admission and Mortality in Patients with Pneumonia. *Tohoku J Exp Med.* 2020;250(4):243-251.
18. Yeh Y-H, Chang J-L, Hsiao P-C, Tsao S-M, Lin CH, Kao S-J, et al. Circulating Level of Lipocalin 2 As a Predictor of Severity in Patients With Community-Acquired Pneumonia. *J Clin Lab Anal.* 2013;27(4):253-260.
19. Naydenova E, Tsanas A, Howie S, Casals-Pascual C, De Vos M. The power of data mining in diagnosis of childhood pneumonia. *J R Soc Interface.* 2016;13(120):20160266.
20. Esposito S, Bianchini S, Gambino M, Madini B, Di Pietro G, Umbrello G, et al. Measurement of lipocalin-2 and syndecan-4 levels to differentiate bacterial from viral infection in children with community-acquired pneumonia. *BMC Pulm Med.* 2016;16(1):103.
21. Fine MJ, Auble TE, Yealy DM, Hanusa BH, Weissfeld LA, Singer DE, et al. A Prediction Rule to Identify Low-Risk Patients with Community-Acquired Pneumonia. *N Engl J Med.* 1997;336(4):243-250.
22. Lim WS, Van Der Eerden MM, Laing R, Boersma WG, Karalus N, Town GI, et al. Defining community acquired pneumonia severity on presentation to hospital: An international derivation and validation study. *Thorax.* 2003;58(5):377-382.

23. Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Schlattmann P, Haase-Fielitz A. Accuracy of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) in Diagnosis and Prognosis in Acute Kidney Injury: A Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Kidney Dis.* 2009;54(6):1012-1024.
24. Huang H, Ideh RC, Gitau E, Thézénas ML, Jallow M, Ebruke B, et al. Discovery and Validation of Biomarkers to Guide Clinical Management of Pneumonia in African Children. *Clin Infect Dis.* 2014;58(12):1707-1715.
25. Yu Z, Jing H, Hongtao P, Furong J, Yuting J, Xu S, et al. Distinction between bacterial and viral infections by serum measurement of human neutrophil lipocalin (HNL) and the impact of antibody selection. *J Immunol Methods.* 2016;432:82-86.
26. Min J-H, Lee H, Chung SJ, Yeo Y, Park TS, Park DW, et al. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin for Predicting Intensive Care Unit Admission and Mortality in Patients with Pneumonia. *Tohoku J Exp Med.* 2020;250(4):243-251.

Tables

Table 1. Clinical and demographic characteristics of the study participants (N=130).

	Bacterial (N=71)	Non-filiated (N=42)	Viral (N=17)	<i>p</i>
Demographic data				
Age (years)	68.0 (53.5-79.0)	72.5 (59.0-82.0)	82.0 (76.0-83.0)	0.02^A
Gender, male	50 (70.4)	28 (66.7)	6 (35.3)	0.03^A
BMI (kg/m ²)	25.6 (22.3-29.1)	26.9 (23.9-29.8)	27.9 (22.7-30.8)	0.3
Caucasian race	70 (98.6)	41 (97.6)	16 (94.1)	0.3
Current smoker	18 (25.3)	12 (28.6)	0	0.03^{A,C}
Ex-smoker	23 (32.4)	17 (40.5)	6 (35.3)	0.7
Comorbid conditions				
Charlson index ≥ 4	10 (14.1)	4 (9.5)	2 (11.8)	0.9
Immunosuppression ¹	4 (5.6)	0	2 (11.8)	0.09
Prior antibiotic treatment ²	9 (12.7)	7 (16.7)	4 (23.5)	0.5
Pre-hospital treatment ³	11 (15.5)	4 (9.5)	3 (17.6)	0.6

Clinical features on presentation

Time from symptom onset to ED visit (hours)	48.0 (24.0-108.0)	84.0 (48.0-138.0)	72.0 (48.0-96.0)	0.1
Fever ($\geq 38^{\circ}\text{C}$)	35 (49.3)	12 (28.6)	6 (35.3)	0.09
Dyspnoea	50 (70.4)	32 (76.2)	12 (70.6)	0.8
Tachypnea (≥ 20 rpm)	45 (69.2)	24 (64.9)	8 (61.5)	0.8
Cough	63 (88.7)	35 (83.3)	16 (94.1)	0.6
Purulent sputum	30 (42.3)	19 (45.2)	9 (52.9)	0.8
Pleuritical chest pain	30 (42.3)	10 (23.8)	3 (17.6)	0.05
Septic shock	16 (22.9)	3 (7.1)	2 (11.8)	0.08
Respiratory failure	38 (55.1)	23 (54.8)	13 (76.5)	0.3
PSI at admission ≥ 4	38 (54.3)	14 (33.3)	11 (64.7)	0.1
CURB-65 score at admission ≥ 3	11 (15.7)	7 (16.7)	3 (17.6)	0.6

Laboratory findings

LCN2 (ng/mL)	122.0 (62.6-255.3)	88.2 (59.8-153.0)	112.3 (67.0-124.8)	0.08
CRP (mg/L) at admission	253.0 (79.0-360.7)	147.0 (48.5-276.5)	89.5 (43.5-140.0)	0.001 ^{A,B}

WBC count (x10 ⁹ /L) at admission	13.5 (9.7-19.3)	12.8 (10.4-16.8)	10.3 (6.6-14.0)	0.08
Lymphocytes count (x10 ⁹ /L) at admission	1.0 (0.7-1.4)	1.2 (0.8-1.6)	1.2 (0.7-1.7)	0.4
Evolution and Outcome				
Time to clinical stability (days)	2 (1-4)	2 (1-4)	2 (1-3)	0.6
UCI admission	7 (9.9)	3 (7.1)	1 (5.9)	0.9
Need for mechanical ventilation	3 (4.2)	2 (4.8)	1 (5.9)	1
Length of hospital stay (days)	6.0 (4.0-8.8)	5.5 (1.2-9.0)	6.0 (5.0-9.0)	0.7
In-hospital mortality	0	0	1 (5.9)	0.1

Abbreviations: BMI: Body mass index; ED: Emergency Department; FIO₂: fraction of inspired oxygen; ICU: Intensive Care Unit; MV: mechanical ventilation; PSI: Pneumonia severity Index; CURB: confusion, urea, respiration, blood pressure, age ≥ 65 years; LCN2: lipocalin-2; CRP: C-reactive protein; WBC: White blood cells.

Data presented as median (interquartile range) if continuous variable or number (%) if categorical variable.

P values: *t* test/ Mann-Whitney U (depending upon distribution), Fisher's Exact test for proportional data.

^A: statistically significant between Bacterial and Viral

^B: statistically significant between Bacterial and Non-filiated

^C: statistically significant between Non-filiated and Viral

¹Immunosuppression: chronic corticosteroid therapy, severe neutropenia, solid or hematopoietic organ transplantation, acquired immunodeficiency syndrome and use of chemotherapy, immunosuppressive agents or biological drugs.

²Prior antibiotic treatment: intake of antibiotic 3 months before hospitalization.

³Pre-hospital antibiotic treatment: oral intake of antibiotic > 24 hours prior to hospitalization for the same episode of acute disease.

Table 2. Biomarker concentration by CURB-65 and PSI classification.

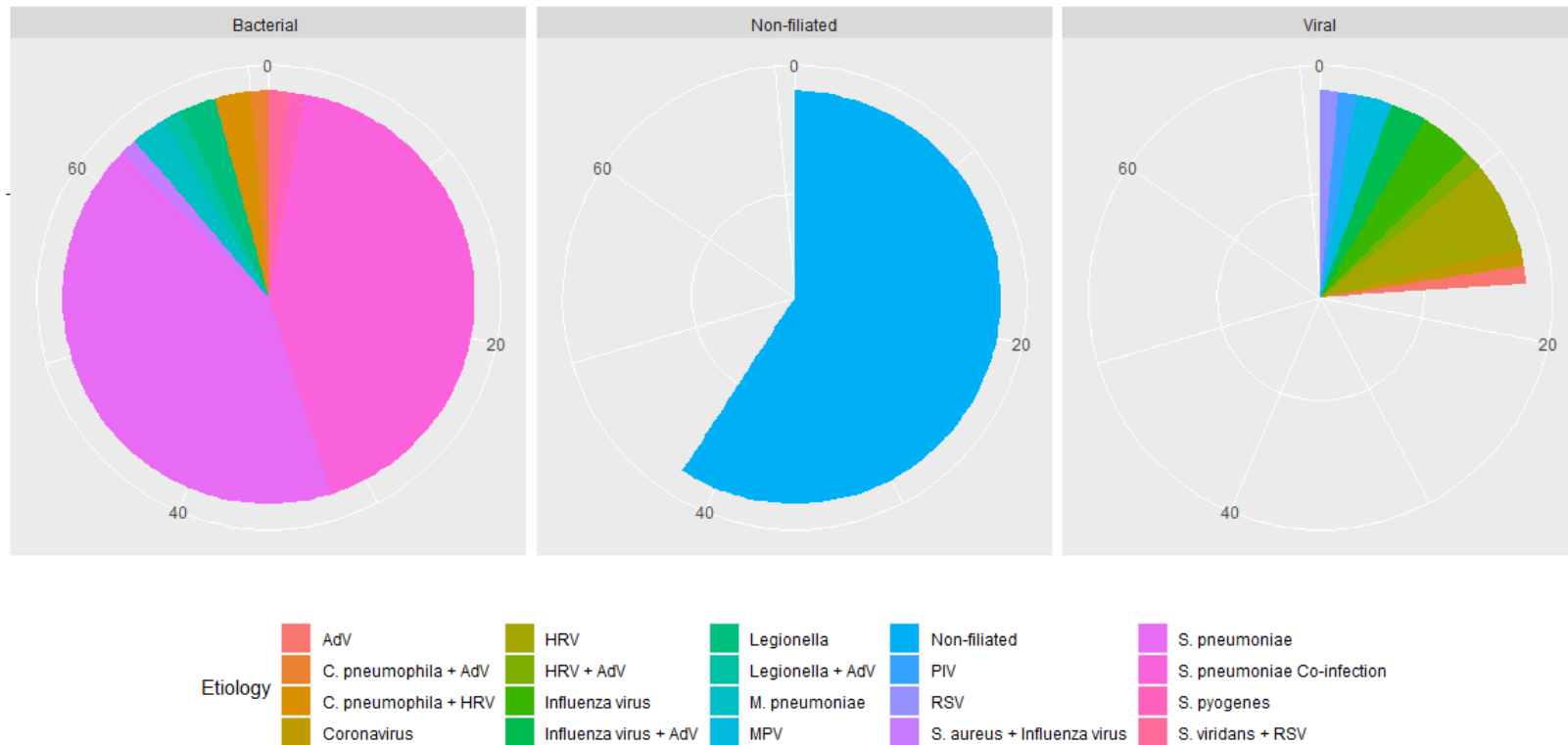
	CURB-65			PSI		
	0/1	2	≥3	I/II/III	IV	V
Number (%)	71 (55.0)	37 (28.7)	21 (16.3)	66 (51.2)	44 (34.1)	19 (14.7)
LCN2 (ng/mL)	88.2 (53.5-144.4) ^{b,c}	115.0 (62.0-243.1) ^{a,c}	265.0 (138.8-380.2) ^{a,b}	90.9 (54.1-159.6) ^f	107.4 (59.9-176.5) ^f	265.0 (120.3-352.4) ^{d,e}
CRP (mg/L)	195.0 (67.8-297.8)	143.0 (44.7-326.0)	240.0 (85.5-312.2)	193.0 (59.6-299.0)	203.0 (76.1-326.0)	93.0 (48.1-289.0)
WBC count (x10⁹/L)	11.5 (8.5-16.1)	12.8 (10.3-19.3)	16.6 (10.9-23.2)	12.7 (8.9-16.1)	13.2 (9.3-19.3)	13.8 (8.4-22.2)
Lymphocytes count (x10⁹/L)	1.1 (0.7-1.5)	1.0 (0.5-1.4)	1.3 (0.8-1.7)	1.1 (0.7-1.5)	1.0 (0.7-1.6)	1.2 (0.7-1.7)

Abbreviations: CURB-65: confusion, urea, respiration, blood pressure, age ≥ 65 years; PSI: Pneumonia severity Index; LCN2: lipocalin-2; CRP: C-reactive protein; WBC: White blood cells.

^a $p < 0.05$, vs CURB-65 0/1; ^b $p < 0.05$, vs CURB-65 2; ^c $p < 0.05$, vs CURB-65 ≥3; ^d $p < 0.05$, vs PSI ≤90; ^e $p < 0.05$, vs PSI 91–130; ^f $p < 0.05$, vs PSI ≥131.

Figures

Figure 1. Etiology of community-acquired pneumonia episodes included in the study (N=130).



Abbreviations. AdV: adenovirus; *C. pneumoniae*: *Chlamydomphila pneumoniae*; HRV: human rhinovirus; *M. pneumoniae*: *Mycoplasma pneumoniae*; MPV: metapneumovirus; PIV: parainfluenza virus; RSV: respiratory syncytial virus; *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*; *S. pyogenes*: *Streptococcus pyogenes*; *S. viridans*: *Streptococcus viridans*.

S. pneumoniae co-infection: 15 HRV, 5 Influenza virus, 3 Coronavirus, 2 RSV, 1 AdV, 1 MPV, 1 PIV, 1 *Haemophilus influenzae*, 1 *Moraxilla catharralis*

Figure 2. Concentration of LCN2, CRP and WBC count among patients with bacterial, non-filiated and viral CAP (above); and between bacterial and Non-bacterial CAP (below).

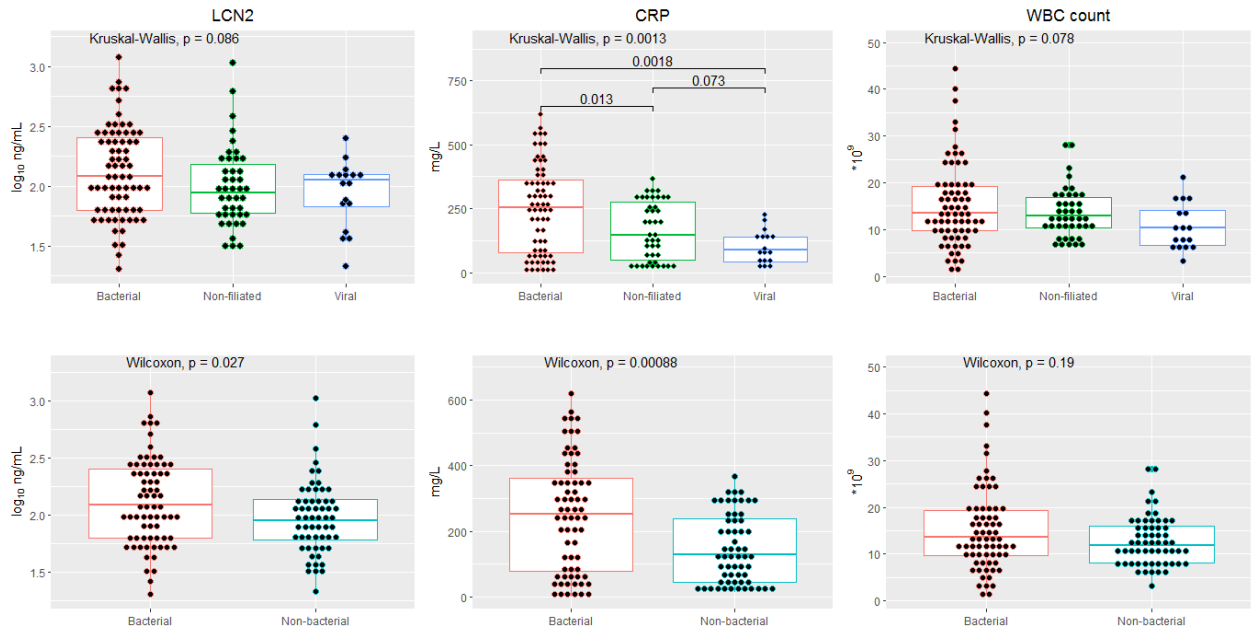
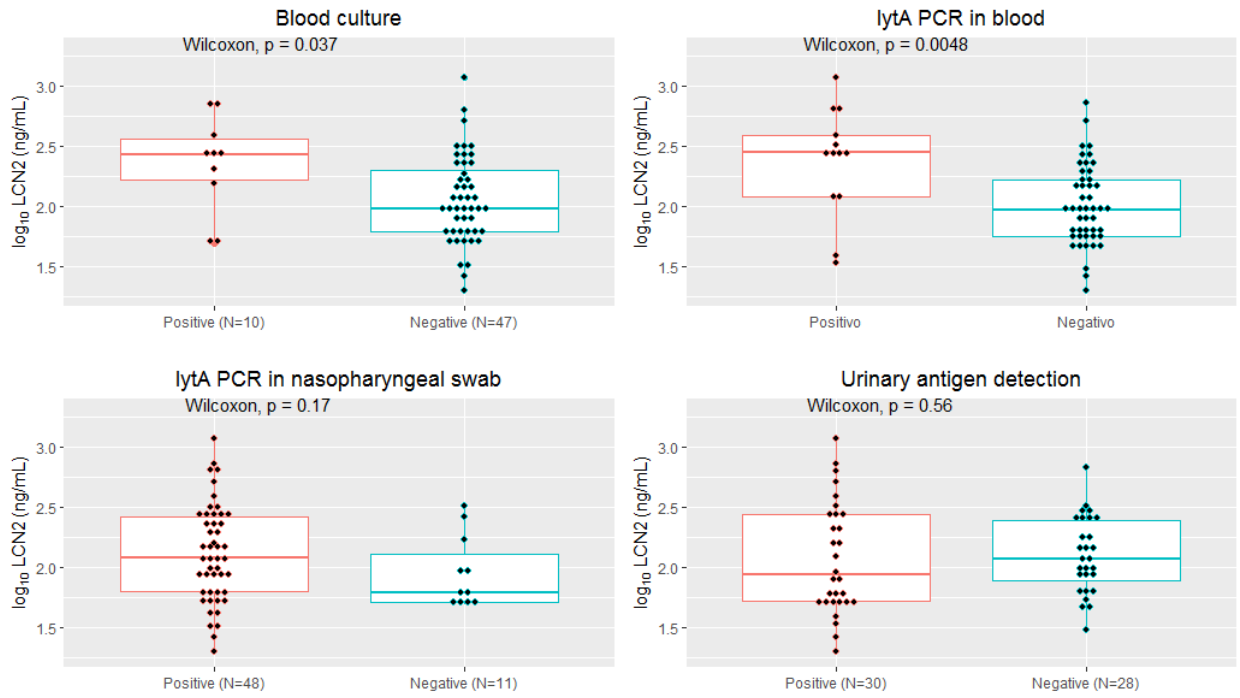


Figure 3. Concentration of LCN2 in pneumococcal community-acquired pneumonia episodes depending on the result obtained from blood culture (positive or negative for *S. pneumoniae*), *lytA* PCR in blood, *lytA* PCR in nasopharyngeal swab and urinary antigen detection.



Supplementary material

Clinical evaluation and follow up

All CAP episodes were evaluated by an infectious diseases' consultant before inclusion. All chest radiographs were reviewed by a radiologist confirming the presence of a new infiltrate.

The following variables were prospectively collected: age, gender, race, vaccination status, immunosuppression (acquired immunodeficiency syndrome, chronic corticosteroid therapy, severe neutropenia, solid or hematopoietic organ transplantation and use of chemotherapy, immunosuppressive agents or biological drugs), clinical, microbiological and laboratory data at admission, evolution, length of stay and outcomes. Variables related to comorbidities (based on Charlson severity index), smoking habit and alcohol abuse were also recorded. Prior antibiotic exposure (in the last 3 months), or acute exposure (last 24 hours before admission) were recorded.

Microbiological tests

Conventional methods included sputum, nasopharyngeal (NP) swab (Deltaswab amies, Deltalab, Rubí, Spain) and blood culture. Sputum samples were processed for Gram stain. Sputum samples were considered of good-quality if they had <10 squamous cells and >25 leukocytes per low-power field. Blood cultures were processed with the BacT-Alert® system (bioMérieux, Marcy-Etoile, France). Identification of isolates were performed by MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) and antimicrobial susceptibility was tested by the

microdilution method, following the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing methods and criteria (EUCAST). Immunochromatographic test for *Streptococcus pneumoniae* and *Legionella pneumophila* serogroup I antigen detection in urine was performed (BinaxNOW® assays, Abbott).

Given the lack of a diagnostic gold standard, pneumococcal pneumonia was defined by a composite diagnostic variable: detection of *S. pneumoniae* by conventional methods and/or a positive rtPCR-*lytA* in blood, urine or NP swabs (NP cut-off ≥ 8000 copies/mL) (1). Defined CM were blood culture, good-quality sputum Gram stain, sputum culture or an immunochromatographic test for detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen in urine.

Multiplex-PCR for respiratory viruses detection was performed in NP swabs (Allplex™ Respiratory Panel 1, 2 and 3, Seegene®, Seoul, Korean Republic): influenza A and B virus; respiratory syncytial virus (RSV) A and B; parainfluenza virus (PIV) 1, 2, 3 and 4; coronavirus 229E, NL63E and OC43; human rhinovirus (HRV); adenovirus (AdV); metapneumovirus (MPV); bocavirus (HBoV) 1/2/3/4; and enterovirus (HEV).

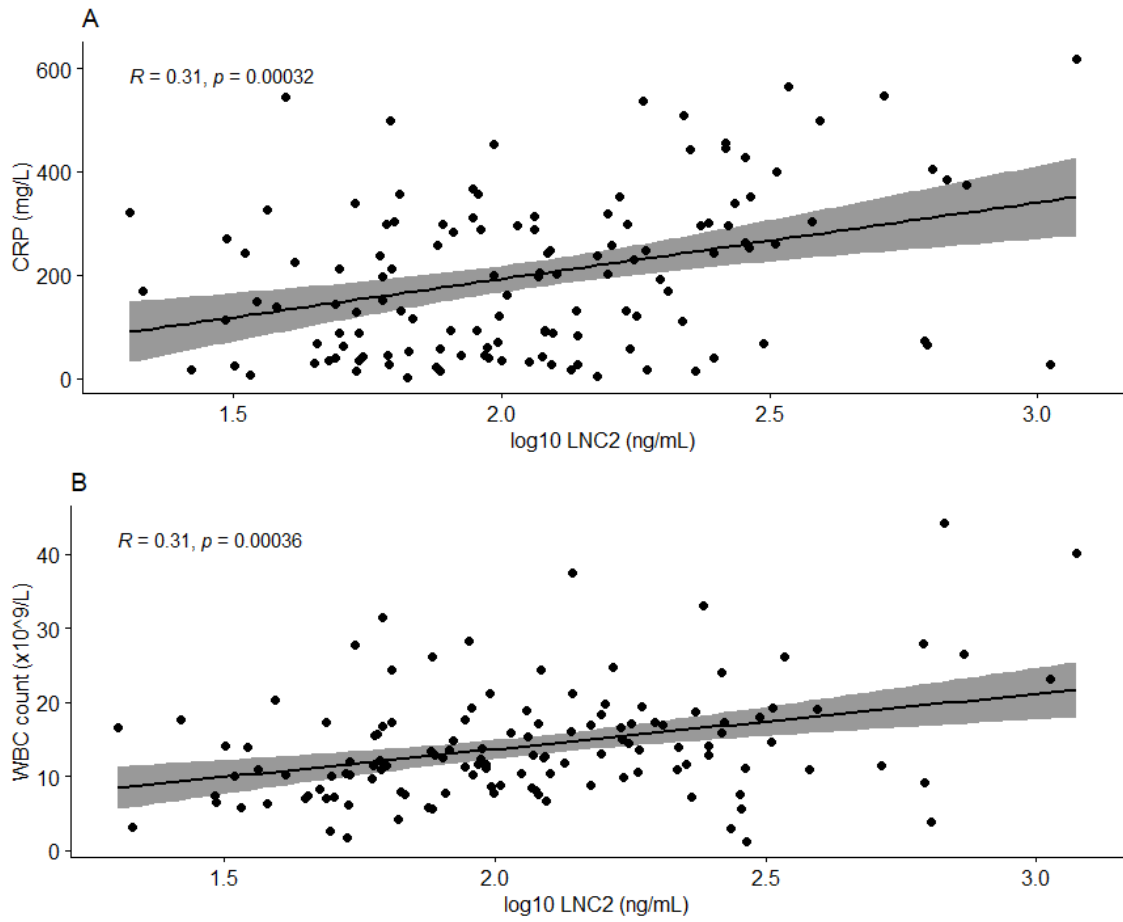
In patients with no pneumococcal-CAP, serologic methods (on admission and 3–4 weeks thereafter) were used to detect antibodies against *L. pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* and *Coxiella burnetii*.

References

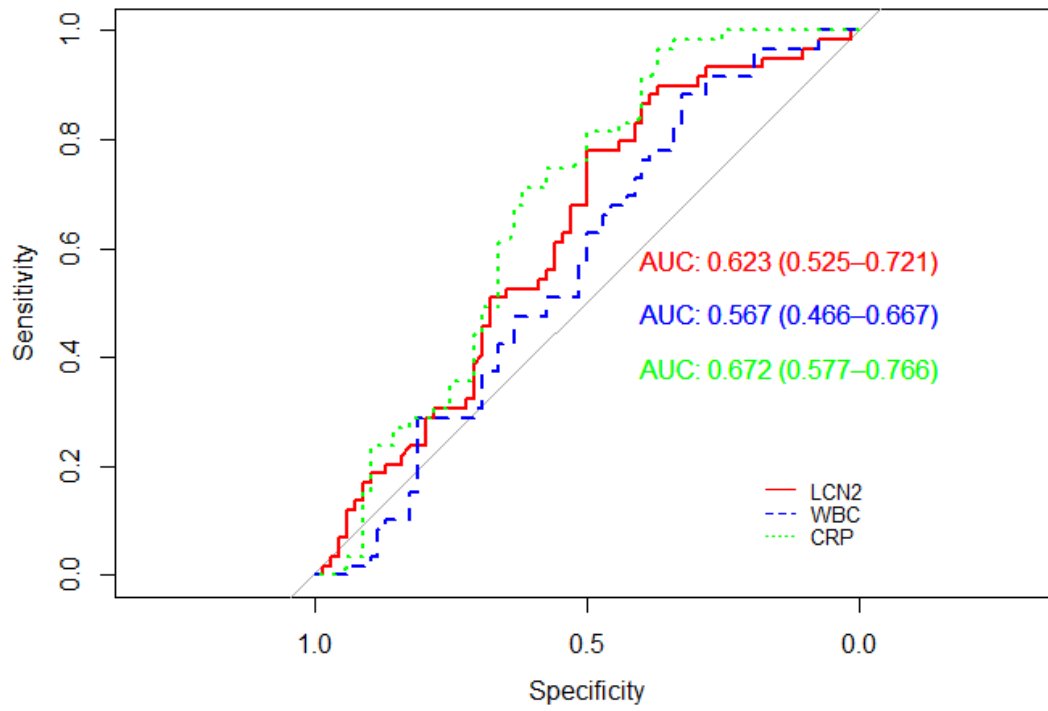
1. Sidhu M, Wong M, Karstaedt A, Jansen KU, Albrich WC, Mareletsi T, et al. Use of a Rapid Test of Pneumococcal Colonization Density to Diagnose Pneumococcal Pneumonia. Clin Infect Dis. 2011;54(5):601–9.

Supplementary Figure 1. Correlation between plasma LCN2/CRP and LCN2/WBC count

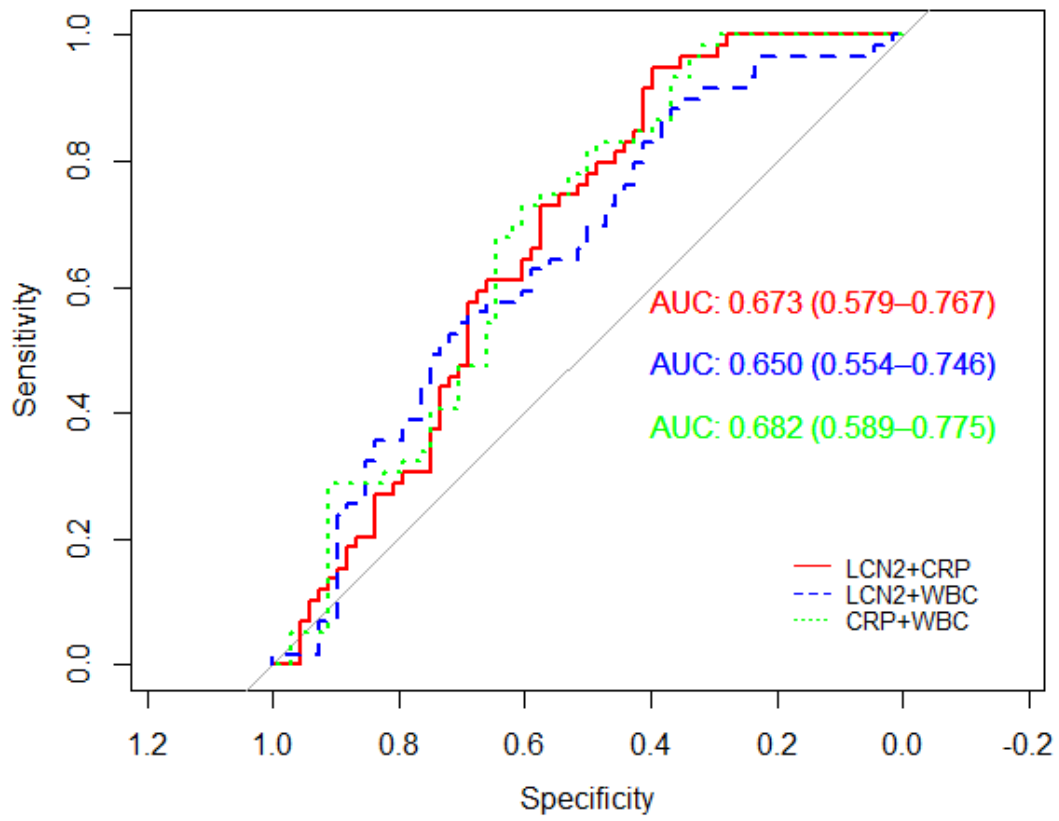
at admission.



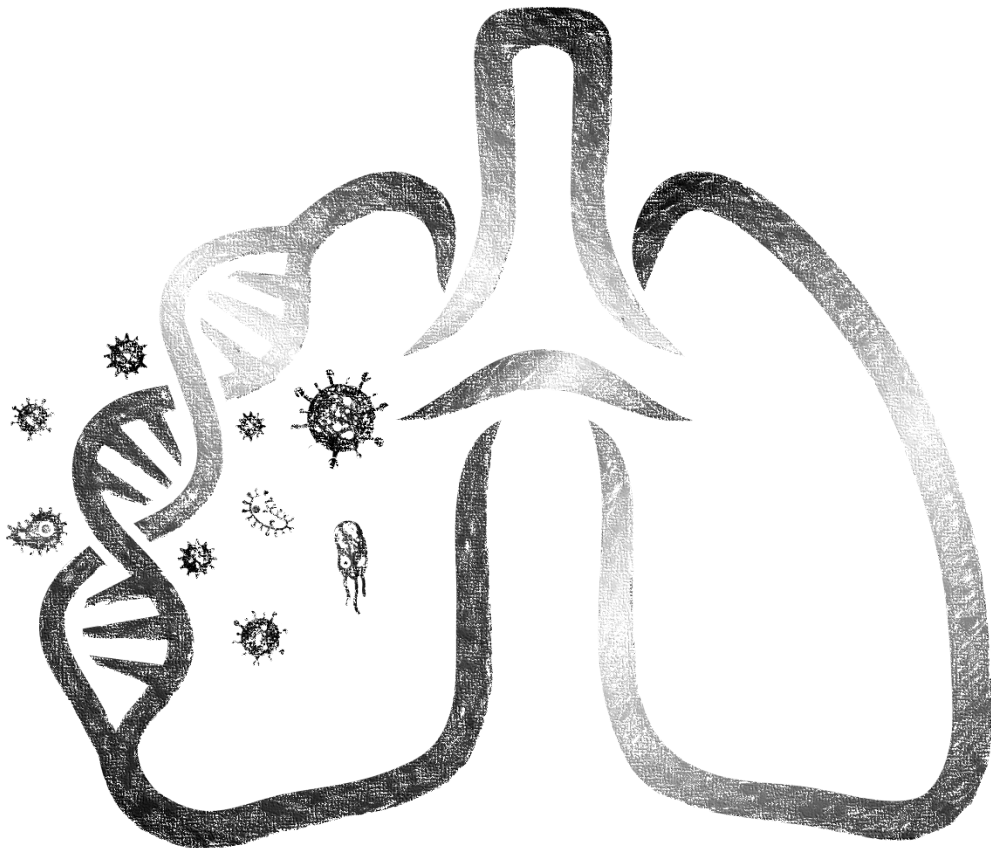
Supplementary Figure 2. Comparison among the paired ROC curves of LCN2, CRP and WBC.



Supplementary Figure 3. Comparison among the paired ROC curves of the combination of LCN2 and CRP, LCN2 and WBC or CRP and WBC.



DISCUSIÓN



5. Discusión

Las infecciones de tracto respiratorio son una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial (7). En España, la incidencia de NAC en adultos es de 2-10 casos por 1 000 habitantes/año, ascendiendo a 25-35 casos por 1 000 en mayores de 70 años (12). Por otro lado, la NIH es una de las principales causas de infección hospitalaria, con tasas del 10-20% (5-10 casos/1 000 hospitalizaciones) en pacientes sin ventilación mecánica y tasas hasta 20 veces superiores en pacientes ventilados (15). Por su parte, la NAVM es la primera causa de infección en los pacientes con ventilación mecánica, suponiendo el 30% de las infecciones adquiridas en la UCI (18), con una morbi-mortalidad asociadas muy elevadas (16). De hecho, es la principal causa de infección en las UCIs españolas. El correcto diagnóstico de estas infecciones es crucial para el paciente y, en concreto, el diagnóstico microbiológico de la neumonía es esencial para asegurar un tratamiento antibiótico óptimo, lo que se asocia con una menor mortalidad (42). Paradójicamente, dada la disponibilidad de tratamiento antibiótico para estas infecciones, ha habido una inquietante pérdida de interés en averiguar cuál es el patógeno involucrado (253). La defensa de este cambio se basa en el hecho de que el tratamiento empírico generalmente funciona y que los tiempos de respuesta de las pruebas microbiológicas no son suficientemente cortos teniendo en cuenta la necesidad de iniciar rápidamente el tratamiento con antibióticos. El diagnóstico etiológico se consigue sólo en la mitad de los casos aproximadamente (88). Por este motivo, en la mayoría de casos, se inicia tratamiento empírico para evitar retrasar el inicio del tratamiento. No obstante, un tratamiento inicial inadecuado se asocia con una mayor mortalidad (89,90), y un exceso de uso de antibióticos a un mayor coste y riesgo de aparición de resistencias antibióticas (15).

Entre las razones por las que necesitamos un diagnóstico etiológico de la neumonía se encuentran las siguientes:

- Confirmar o descartar la infección.
- Detectar coinfecciones por otros virus o bacterias potencialmente tratables o aislables.

Discusión

- Identificar patógenos resistentes a los tratamientos.
- Posibilitar la desescalada de la antibioterapia inicial.
- Ajustar si no hay respuesta al tratamiento inicial.
- Mejorar las medidas de control de la infección.
- Identificar ciertos patógenos con implicación sobre la salud pública (SARS-CoV-2, *L. pneumophila*).
- Adaptar la epidemiología cambiante de la neumonía.

El diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto respiratorio inferior presenta importantes limitaciones debido a su baja rentabilidad y a la dificultad de obtener muestras de calidad adecuada. El diagnóstico microbiológico convencional de la neumonía tiene importantes limitaciones y las técnicas moleculares supusieron un gran avance en el diagnóstico rápido de estas infecciones, especialmente en las de etiología vírica (91,254) (**Anexo 1**). Sin embargo, viendo las cifras de incidencia y las implicaciones que tienen estas infecciones, todavía se requiere más investigación e inversión en el área del diagnóstico microbiológico centradas en la búsqueda de pruebas de diagnóstico rápidas, rentables, sensibles y específicas para identificar los microorganismos causantes de la neumonía que contribuyan al manejo del paciente favoreciendo una terapia más dirigida, especialmente cuando haya factores de riesgo para patógenos resistentes a antibióticos (255). Iniciativas como el proyecto INHALE en Reino Unido (Potential of molecular diagnostics for hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia in UK Critical Care) (<https://www.ucl.ac.uk/inhale-project/overview>) son necesarias para fomentar el desarrollo y evaluación de estas nuevas técnicas diagnósticas.

Todas las nuevas pruebas de diagnóstico deberían ser evaluadas teniendo en cuenta el impacto sobre decisiones de tratamiento y la evolución del paciente (4). Serían necesarios estudios prospectivos para evaluar si realmente esta mejora en las técnicas diagnósticas supone un cambio en la práctica clínica. ¿El hecho de que mejore el tiempo de respuesta y las técnicas de laboratorio cambia la conducta del clínico? Rogers *et al.* publicaron un estudio evaluando el impacto de la incorporación de FilmArray Rapid Respiratory Panel en el pronóstico de niños ingresados por una infección respiratoria aguda (129). Se demostró que

la implementación de esta técnica reducía de manera significativa la duración de la estancia hospitalaria, así como el tiempo del aislamiento y la duración del tratamiento antibiótico, siempre y cuando los resultados estuviesen disponibles en las primeras cuatro horas. En otro estudio (117), se evaluó el impacto de la técnica molecular PCR-based Unyvero Pneumonia en el manejo de los pacientes con neumonía nosocomial grave. El ensayo Unyvero Pneumonia no solo redujo el tiempo hasta la obtención del resultado en comparación con el cultivo convencional (4 frente a 48-96 h), sino que también detectó un número importante de infecciones múltiples (55,1 frente a 8,2%). En cuanto al impacto sobre el manejo de pacientes, el tratamiento empírico inicial fue cambiado en el 67,3% de los casos basándose en los resultados del ensayo, incluida la detección de los genes de resistencia. Shengchen *et al.* evaluaron el FilmArray Respiratory Panel para la detección de virus y patógenos atípicos en pacientes hospitalizados con neumonía y observaron una reducción en la duración del tratamiento antibiótico intravenoso, en la duración y coste de la hospitalización, así como una mejora en el desescalado precoz del tratamiento antibiótico comparado con el uso de PCR convencionales (256).

No cabe duda de que hay que ser muy selectivos con el uso de estas técnicas debido a su alto coste y esto pasa por una buena comunicación (121). La IDSA hace unas recomendaciones sobre cuál es la situación ideal para utilizar estos paneles de diagnóstico molecular: probabilidad pretest intermedia y severidad de la enfermedad intermedia (257). Ésta es la situación en la que una prueba negativa puede permitir el mantenimiento de la cobertura empírica inicial de un potencial patógeno, mientras que una prueba positiva puede permitir que la terapia se dirija frente a un patógeno en particular, aumentando así la eficacia terapéutica, disminuyendo la toxicidad evitable del fármaco y reduciendo potencialmente los medicamentos adicionales innecesarios.

Por otro lado, de nada sirve disponer de una técnica de diagnóstico rápido, si durante las noches y fines de semana no pueden realizarse. De ahí, la importancia de contar con un microbiólogo clínico las 24 horas del día. Además, la comunicación del resultado de forma inmediata entre el laboratorio y el clínico es fundamental. Sistemas automatizados de alertas, como el publicado por Moradi *et al.* (258), pueden ayudar a reducir el uso de antibióticos cuando los diagnósticos sugieren una infección viral del tracto respiratorio.

Discusión

Las técnicas de diagnóstico rápido (TDR) son aquellas cuyo resultado pueda darse en menos de siete horas (un turno habitual de trabajo) en comparación con las técnicas convencionales de cultivo bacteriano (18–24 horas) o viral (48 o más horas). Algunas de estas TDR, dada la sencillez y rapidez de su realización, obtención e interpretación de los resultados, se conocen como pruebas POC. Estas técnicas presentan un claro beneficio para el paciente, que podría disponer del diagnóstico y, en función del resultado, del tratamiento en una misma consulta. La importancia de un diagnóstico rápido es todavía mayor en pacientes ingresados, ya que la administración intravenosa de antibiótico es crucial para disminuir la morbi-mortalidad. En pacientes no ingresados, no obstante, también resulta crucial identificar si el paciente necesita antibiótico o no. En general, el uso de TDR en el diagnóstico de la infección respiratoria puede ayudar a:

- Disminuir el uso de antibióticos, dado que muchas de las neumonías son de etiología viral.
- Utilizar terapia antivírica adecuada en casos concretos.
- Minimizar el uso de pruebas diagnósticas innecesarias.
- Disminuir el tiempo de estancia hospitalaria.
- Permitir, en caso necesario, una rápida implementación de medidas de aislamiento que limiten la transmisión nosocomial.

Además, en la neumonía de origen bacteriano, las TDR, al detectar el antígeno del patógeno diana o sus ácidos nucleicos, se ven afectadas en mucha menor medida que el cultivo en caso de que ya se haya instaurado tratamiento antibiótico.

Aunque las técnicas POC están pensadas para su realización a pie de cama del enfermo, estas técnicas deben realizarse en los laboratorios de Microbiología, ya que es donde se encuentra el personal especializado en la interpretación de este tipo de pruebas y se cuenta con pruebas complementarias en caso de que sean necesarias. Las principales limitaciones en el desarrollo y uso de este tipo de técnicas de diagnóstico molecular son: (1) el coste; (2) la falta de muestras adecuadas del tracto respiratorio en algunos pacientes; (3) la ausencia de estándares para su validación; (4) la existencia de datos limitados para establecer

umbrales cuantitativos que nos distingan contaminación de infección; (5) la dificultad de interpretación cuando se detectan múltiples patógenos potenciales; (6) la ausencia de información en general sobre sensibilidad a los antibióticos; y (7) la limitada utilidad que presentan estas TDR en laboratorios de Microbiología que no tengan servicio 24 horas.

El esquema diagnóstico de referencia utilizado para identificar bacterias causantes de infecciones respiratorias sigue siendo el cultivo convencional cuantitativo previa tinción de Gram a partir de la muestra directa, seguido de identificación y realización de antibiograma de los microorganismos patógenos. Este proceso presenta una baja sensibilidad, especialmente si la muestra se ha tomado después de iniciar el tratamiento antibiótico. Otro inconveniente es que el proceso requiere de un tiempo mínimo de dos días. En este período, muchos pacientes se tratan de forma empírica con antibióticos de amplio espectro. Los métodos moleculares se utilizan de forma rutinaria en algunos laboratorios de Microbiología, principalmente para la identificación de microorganismos que no se pueden cultivar, difíciles de cultivar o de lento crecimiento, como son los virus y los microorganismos causantes de neumonía atípica. En comparación sobre todo con el cultivo convencional, los métodos moleculares tienen la capacidad de detectar simultáneamente múltiples microorganismos y factores de resistencia, el tiempo de respuesta es de unas pocas horas, y en algunos casos se trata de sistemas integrados que permiten la extracción y detección en la misma plataforma ([Anexo 1](#)). Sin embargo, las técnicas moleculares tampoco están exentas de limitaciones. Hay que destacar que la sensibilidad y la especificidad son variables dependiendo de la técnica y el tipo de estudio, la detección de microorganismos no viables o de ácidos nucleicos extracelulares, así como la escasez de ensayos clínicos que demuestran su impacto sobre el pronóstico de pacientes con infecciones respiratorias. No obstante, en la mayoría de casos, el principal obstáculo para la incorporación de las técnicas moleculares en la rutina del laboratorio de Microbiología Clínica es el elevado coste y la necesidad de un equipamiento sofisticado. Por ello, en muchos casos, su uso queda restringido a unos grupos concretos de pacientes (p. ej., enfermos críticos o inmunodeprimidos).

En relación a las técnicas moleculares de diagnóstico, en el año 2000 se diseñó por primera vez un ensayo de tipo LAMP (149). A diferencia de las PCR convencionales, en las

Discusión

que son necesarios una serie de ciclos de cambios de temperatura para que se produzca la amplificación de los ácidos nucleicos, estas técnicas permiten la amplificación a una temperatura constante. Las técnicas de amplificación isotérmica presentan sensibilidades y especificidades similares a las de la PCR, con la ventaja de requerir una instrumentación más sencilla y barata, por lo que podrían utilizarse con menos restricciones.

Casi todas las pruebas diagnósticas sindrómicas disponibles para identificar patógenos que causan infecciones del tracto respiratorio incluyen virus y bacterias atípicas (105), pero son pocas las que incluyen como dianas los principales patógenos bacterianos que causan NIH (117,259–261), siendo el precio de estos muy elevado. En esta línea, se ha evaluado el uso de la LAMP como una herramienta de diagnóstico rápido y barato para identificar los principales patógenos implicados en NIH directamente de muestras clínicas respiratorias con resultados prometedores ([Artículo 1](#)). La concordancia entre LAMP y cultivo fue del 88% para muestras de LBA y del 95% para muestras de BAS/AT. En este caso, como la técnica LAMP se ve mucho menos afectada que la PCR por posibles inhibidores en la muestra (159), en condiciones de alta concentración de bacterias, se puede evitar la extracción de los ácidos nucleicos y, por lo tanto, reducir el tiempo de respuesta, incluida la preparación de la muestra y LAMP, hasta alrededor de una hora. Kang *et al.* realizaron un estudio a nivel nacional en China en el que se comparó el ensayo qLAMP con cultivo para detectar ocho patógenos bacterianos respiratorios en esputo, detectando patógenos en 1 047 (69,28%) de 1 533 pacientes incluidos (206). En ese estudio, utilizaron un kit para la extracción de ácidos nucleicos. En el [Artículo 1](#), aunque el número de muestras incluidas es limitado, se ha demostrado que la realización de la LAMP sobre la muestra respiratoria sin un paso de extracción estricto es posible. El costo también es importante. Se ha calculado que el ensayo LAMP (considerando reactivos para extracción de ácidos nucleicos, realización de la LAMP y material plástico) para detectar los seis patógenos que causan NIH incluidos en este estudio cuesta unos 12 euros. Por ello, podemos afirmar que la LAMP puede ser útil como herramienta complementaria al cultivo, permitiendo una rápida identificación de los microorganismos causante de la infección.

A pesar de los avances en las técnicas de identificación, el desarrollo de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana más rápidas ha sido más lento, lo que limita el impacto potencial de la identificación temprana de patógenos. Elegir el antibiótico correcto es la pieza fundamental del tratamiento de las infecciones. Si bien esto parece intuitivo, la definición de “correcto” es todo un desafío. Al elegir un régimen antimicrobiano empírico, el clínico debe sopesar el riesgo de un resultado deficiente para el paciente debido a un posible tratamiento insuficiente de un patógeno resistente a los medicamentos frente al reto que supone un uso adecuado de los antimicrobianos. Si bien es difícil elegir el mejor agente empírico, los clínicos dependen de los resultados del laboratorio de Microbiología para seleccionar la terapia dirigida más apropiada. Tradicionalmente, esto ha dependido de los resultados del cultivo y el antibiograma, aunque ese paradigma puede estar cambiando (262). La prueba de sensibilidad genotípica consiste en la detección de genes de resistencia expresados en un organismo específico por métodos moleculares. Las pruebas fenotípicas son el método estándar para orientar las decisiones de tratamiento antimicrobiano, pero la detección rápida de la presencia (o ausencia) de un gen de resistencia puede permitir una terapia antimicrobiana mejorada independientemente de los resultados de susceptibilidad fenotípica. Un aspecto importante a destacar es que, en muchos casos, la ausencia de un gen de resistencia no necesariamente predice la susceptibilidad a un fármaco en particular. En consonancia con este problema, está el reducido número de genes de resistencia incluidos en los paneles, lo que dificulta la administración de los antimicrobianos incluso en ausencia de genes de resistencia específicos. Finalmente, la detección de genes de resistencia no necesariamente predice el fracaso terapéutico, ya que puede que estos genes no se estén expresando. A pesar de estas limitaciones, se han desarrollado numerosas técnicas diagnósticas que incluyen la detección de genes de resistencia. No debemos olvidar que los métodos genotípicos en lugar de reemplazar a las pruebas de fenotípicas, las complementan.

Como ya se ha comentado, en los últimos años, se han desarrollado varias pruebas moleculares sindrómicas rápidas para el diagnóstico de la neumonía. Estas técnicas ofrecen el potencial de revolucionar el tratamiento al proporcionar información a los clínicos en “tiempo real” sobre los patógenos presentes y también sobre su probable sensibilidad a los

Discusión

antibióticos al detectar también marcadores genotípicos de resistencia. Múltiples estudios han demostrado la precisión diagnóstica superior de las plataformas basadas en PCR para detectar patógenos bacterianos en el esputo en comparación con el cultivo estándar.

En esta línea, la evaluación del sistema eazyplex® SuperBug CRE (Amplex Diagnostics GmbH, Gars-Bahnhof, Germany) mostró una concordancia del 100% entre el fenotipo inferido y los resultados ([Artículo 4](#)). Los resultados positivos se obtuvieron antes de los 10 minutos. Los pacientes infectados con cepas productoras de carbapenemasas tienen mayores tasas de mortalidad y, por lo tanto, requieren un tratamiento adecuado precoz (263). La colonización por este tipo de cepas requiere de una detección rápida para prevenir y limitar su diseminación en el ámbito hospitalario. El control de su propagación se basa principalmente en el uso de técnicas de diagnóstico rápidas y la aplicación de estrictas medidas de higiene (264). La expresión heterogénea de genes de resistencia y los fenotipos complejos pueden dificultar al laboratorio la detección mediante pruebas fenotípicas convencionales incluidos los sistemas automatizados de susceptibilidad a los antimicrobianos. Además, en muchos casos, los tiempos de respuesta pueden ser prolongados con estos métodos y, por tanto, pueden no ser clínicamente útiles, particularmente en el caso de pacientes gravemente enfermos. La disponibilidad de una prueba rápida para confirmar la presencia de estos genes de resistencia es esencial para acelerar la toma de decisiones en cuanto al tratamiento. Una posible limitación del estudio fue la falta de aislamientos que expresaran más de una carbapenemasa simultáneamente, aunque esta característica epidemiológica todavía es poco frecuente en España. El sistema eazyplex® SuperBug CRE demostró una gran versatilidad y precisión para la detección rápida de aislamientos que albergan diversos determinantes de resistencia a carbapenémicos. Cabe señalar que el amplio espectro de genes y variantes de genes incluidos en este sistema refleja los más frecuentes en todo el mundo. También se han implementado en los laboratorios otras pruebas rápidas, incluyendo ensayos colorimétricos como la prueba Carba NP y la prueba Blue-Carba (ROSCO Diagnostica) (265,266). Aunque se han combinado con el uso de inhibidores de la β -lactamasa para la discriminación de tipos de carbapenemasas, siguen teniendo menor capacidad discriminativa que la observada en este trabajo (267,268). Además, se han observado resultados falsos negativos con las pruebas colorimétricas con

algunos aislados mucoides, especialmente aislamientos con carbapenemasas de baja actividad, particularmente con cepas productoras de OXA-48 (268).

En los últimos años ha aumentado la resistencia a los antimicrobianos y específicamente a los carbapenémicos en *A. baumannii*. En España se ha producido un incremento de hasta un 40% en los aislados clínicos de *A. baumannii* que presentan resistencia a carbapenémicos desde 2000 a 2010: 86% de los 446 aislados clínicos de *A. baumannii* presentaron resistencia a los carbapenémicos en un estudio de 2010 (269,270). Esta situación es bastante común y recientemente el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC, del inglés “European Center for Disease Prevention and Control”) ha informado de un aumento de $\geq 50\%$ de cepas de *Acinetobacter* spp. invasivas con resistencia a los carbapenémicos en Hungría, Polonia, Bulgaria, Letonia, Italia, España, Chipre, Rumania, Lituania, Grecia y Croacia en el Informe anual de 2018 de la Red Europea de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (EARS-Net, del inglés “European Antimicrobial Resistance Surveillance Network”) (271). Los antibióticos efectivos actuales para el tratamiento de cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos son escasos y no son los agentes terapéuticos más adecuados debido a su pobre farmacocinética, toxicidad (como en el caso de polimixinas) y aparición de resistencias (272,273). Las carbapenemasas cromosómicas y/o plasmídicas son el principal mecanismo de resistencia a los carbapenémicos en este caso, por lo que la detección rápida de carbapenemasas es clave para guiar terapias antibióticas efectivas.

En este sentido, se ha evaluado el test eazyplex® SuperBug Complete A (Amplex Diagnostics GmbH, Gars-Bahnhof, Germany) para la detección de carbapenemasas en cepas de *A. baumannii*, el cual ha permitido la obtención de resultado fiables en 15 minutos ([Artículo 5](#)). La implementación de este sistema en la rutina de los laboratorios clínicos proporcionaría a los clínicos una información valiosa y precoz para la gestión precisa de pacientes con infecciones causadas por *Acinetobacter* spp. resistente a carbapenémicos. Los genes detectados, sin embargo, se limitan a las dianas incluidas en el kit, y las muestras negativas deben evaluarse con otros métodos (pruebas fenotípicas y PCR convencional) para detectar los genes de resistencia no incluidos en el ensayo. Para permitir una implementación en la rutina de los laboratorios, la técnica debería adaptarse en función de

Discusión

la epidemiología local para incluir los genes más frecuentes que codifican carbapenemasas reportados en especies de *Acinetobacter*.

El test eazyplex® SuperBug Complete A ha sido validado por el fabricante para la detección directa a partir de frotis rectales, lo que sugiere que este sistema tiene el potencial de ser usado a partir de otro tipo de muestras de forma directa. Por ello, se planteó la posibilidad de que este test podría usarse directamente a partir de otras muestras clínicas, como son los LBA ([Artículo 6](#)). La detección de genes productores de carbapenemasas en las cepas analizadas utilizando el ensayo eazyplex® SuperBug Complete A concuerdan con los resultados convencionales de PCR. Los valores del tiempo de detección varían según la cepa y el gen, siendo el límite de sensibilidad de 10^3 UFC/ml. Con un tiempo de manipulación máximo de 15 minutos por muestra y un tiempo de ejecución de 30 minutos (aproximadamente 45 minutos en total), este ensayo demuestra ser una gran ventaja en comparación con los métodos de rutina del laboratorio de Microbiología Clínica que necesitan 16-24 h hasta obtener los resultados.

En el caso de la detección de β -lactamasas en *Enterobacterales*, se realizó una comparación entre el sistema eazyplex® SuperBug CRE y el sistema integrado Xpert Carba-R (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) directamente a partir de LBA ([Artículo 7](#)). Con el sistema Xpert Carba-R, se observó una concordancia del 100% para todas las concentraciones. En el caso de eazyplex® SuperBug CRE, la concordancia fue del 100%, 80% y 27% cuando se analizaron concentraciones de 10^4 , 10^3 y 10^2 UFC/mL, respectivamente. Los resultados falsos negativos de eazyplex® SuperBug CRE coincidieron con los valores de Ct más altos para Xpert Carba-R (mediana de Ct de 33.2 y 28.3 para los resultados de eazyplex® SuperBug CRE negativo y positivo, respectivamente; $p < 0,001$). En el caso de concentraciones iniciales de 10^2 UFC/mL, la mayoría de los genes no se detectaron por eazyplex® SuperBug CRE, a diferencia de Xpert Carba-R que sí los detectó. Este es un sistema integrado que incluye un paso de extracción de ADN, lo que aumenta la cantidad de ADN para el paso de amplificación, en comparación con el ensayo LAMP. El tiempo de manipulación para ambos ensayos fue de aproximadamente 15 minutos, pero la preparación de muestras fue más sencilla en el caso de Xpert Carba-R. Con respecto al tiempo hasta la obtención de los

resultados, los de eazyplex® SuperBug CRE estaban disponibles en 30 minutos, mientras que Xpert Carba-R tardó alrededor de 50 minutos. A pesar de que ambos ensayos fueron capaces de detectar los genes diana a concentraciones por debajo del límite diagnóstico de infección en LBA, Xpert Carba-R mostró un límite de detección 10 veces inferior al de eazyplex® SuperBug CRE.

Aunque el sistema Xpert Carba-R estaba diseñado para identificar pacientes que presentan colonización gastrointestinal con organismos productores de carbapenemasas y el sistema eazyplex® SuperBug CRE, para detectar carbapenemasas y BLEE en cepas bacterianas o directamente de hemocultivo positivo, se ha demostrado que estos dos sistemas comerciales también pueden usarse de forma eficaz para la detección de genes de resistencia a carbapenémicos directamente en muestras del tracto respiratorio inferior. Estos resultados podrían utilizarse como prueba de concepto para el desarrollo de estudios con tamaños de muestra más grandes y validar estas pruebas para esta indicación. En esta línea, en un estudio publicado el mismo año (274), han evaluado el uso de Xpert Carba-R directamente en muestras de esputo con muy buenos resultados.

En el caso de los virus, los ensayos basados en LAMP ya se han utilizado también como una alternativa prometedora y económica para el diagnóstico de infecciones por VHS-1. Estudios previos han evaluado el método LAMP para detectar VHS-1 en muestras de líquido vítreo (275), cutáneo (276,277) y cefalorraquídeo (278), pero este estudio es el primero que evalúa el uso de una LAMP en muestras respiratorias ([Artículo 2](#)). La presencia de VHS-1 en LBA está relacionada con la evolución de los pacientes, incluido un aumento de la mortalidad (279). Sin embargo, pocos laboratorios incluyen la detección de VHS-1 en muestras respiratorias de pacientes críticamente enfermos, lo que conduce a un posible diagnóstico erróneo de la infección. Los resultados mostraron una muy buena concordancia entre cultivo y LAMP. Además, el hecho de realizar la LAMP directamente de la muestra ahorró tiempo y mostró resultados similares en comparación con LAMP realizado en el ADN extraído. Se encontraron mínimas discordancias entre cultivo positivo y rtPCR negativo que podrían explicarse por los ciclos de congelación y descongelación (el ADN probablemente se degradó). Por otro lado, hubo un caso de cultivo negativo y LAMP y rtPCR positivos que

Discusión

podría explicarse por la no viabilidad del virus. Esta no es la primera vez que los resultados de LAMP realizados con y sin extracción de ADN han mostrado resultados similares (277). Al evitar el paso de extracción, el método LAMP se puede realizar en poco tiempo y es menos costoso. Los resultados de este estudio demuestran que el ensayo LAMP se puede utilizar como una herramienta de detección rápida para detectar VHS-1 en LBA de estos pacientes. Al ser una técnica barata, podría plantearse el cribado del VHS-1 en esta población de forma rutinaria.

Por su parte, el cribado de CMV en pacientes críticos también parece estar indicado, ya que, como se ha observado en el [Artículo 3](#) y en trabajos previos (280,281), su detección en LBA de este tipo de pacientes se asocia con una estancia hospitalaria más prolongada y una mayor mortalidad. Tradicionalmente, el CMV se ha diagnosticado mediante cultivo celular, pero esto presenta dos limitaciones principales: baja sensibilidad y tiempo prolongado para que el virus crezca. Las técnicas moleculares representan un avance importante tanto en la sensibilidad como en el tiempo de respuesta, sin embargo, siguen siendo costosas. El objetivo de este estudio fue desarrollar un ensayo LAMP para detectar CMV en LBA de pacientes ingresados en UCI y comparar este método con la PCR (método de referencia) y el cultivo ([Resultados adicionales 1](#)). La sensibilidad fue mucho mayor para la LAMP (92,0% después de la extracción, 61,5% después de hervir y 53,8% en LBA directamente) que para el cultivo (28,9%). En cuanto a la especificidad, con ambos métodos fue del 100%. El tiempo medio de respuesta del cultivo celular fue de 19 días, mientras que con la técnica LAMP fue de una hora. No hubo reacciones cruzadas con otros herpesvirus. Al igual que ocurría con la LAMP de VHS-1, esta técnica podría ser utilizada en pacientes críticos, en este caso para el cribado de CMV. Sería especialmente útil donde los recursos sean limitados, ya que es una técnica barata, y cuando se requiera un diagnóstico rápido, ya que es rápida y presenta un alto valor predictivo positivo.

La detección de ADN bacteriano o viral no siempre significa infección. El principal desafío para un nuevo método molecular es reducir el número de resultados falsos positivos (282,283). Los resultados falsos positivos son una de las principales limitaciones de todas las técnicas moleculares actualmente disponibles, lo que muestra la importancia de la

cuantificación para disminuir el número de falsos positivos. Esto es de gran importancia clínica porque los resultados falsos positivos pueden llevar a una prescripción errónea de antibióticos. Por un lado, la amplificación del ADN es un paso crucial de los métodos moleculares, pero no permite la distinción entre bacterias viables y no viables. Por otro lado, es difícil diferenciar entre especies patógenas (infección) y el transporte asintomático de estas bacterias (colonización). No obstante, cabe resaltar que, a pesar de los falsos positivos, el riesgo de abuso de antibióticos es menor que el beneficio de un tratamiento precoz. La carga bacteriana o viral nos puede servir también como marcador de severidad (220).

Para distinguir entre infección y colonización, se establece que una concentración de microorganismos en LBA $\geq 10^4$ UFC/mL es indicativo de infección (284), aunque varios factores pueden modificar esta interpretación. Buchan *et al.* compararon el sistema BioFire FilmArray Pneumonia Plus Panel con los métodos convencionales para el diagnóstico de infecciones del tracto respiratorio inferior en pacientes adultos hospitalizados (132). Los valores semicuantitativos obtenidos por el panel de FilmArray fueron con frecuencia más altos que los valores informados por cultivo, lo que resultó en una concordancia semicuantitativa del 43,6% entre el panel de FilmArray y el cultivo. Sin embargo, todas las dianas bacterianas informadas como $>10^5$ UFC/mL en cultivo fueron informadas como $\geq 10^5$ copias genómicas/mL por el panel de FilmArray. En un estudio anterior que evaluó a Xpert Carba-R en muestras de LBA, se propuso un valor de corte para distinguir entre infección (Ct 24,7 correspondió a un recuento de 10^5 UFC/mL) y colonización (Ct $> 26,9$ correspondió a un recuento de $<10^4$ UFC/mL) (179). Aunque se observó una buena correlación entre el valor de Ct para Xpert Carba-R y la concentración bacteriana ($r = -0,81$; $p < 0,001$), debido al número limitado de muestras no se pudo establecer un valor de corte ([Artículo 7](#)). Esto no se observó con los resultados de eazyplex[®] SuperBug CRE ($r = 0,45$; $p < 0,001$). Además de ser una técnica sencilla, barata y útil para el diagnóstico de NIH bacteriana, la LAMP desarrollada para la detección de bacterias en NIH se puede utilizar con un enfoque semicuantitativo extrapolando el tiempo de resultado con las UFC/mL en BAS y AT ($r = 0,71$, $p < 0,01$) ([Artículo 1](#)). En LBA, los datos disponibles no eran suficientes para obtener un resultado significativo (datos no mostrados). Si la cuantificación es inferior a 10^2 - 10^3 UFC/mL, la LAMP probablemente no proporcionará un resultado positivo, pero en general se considerará el

Discusión

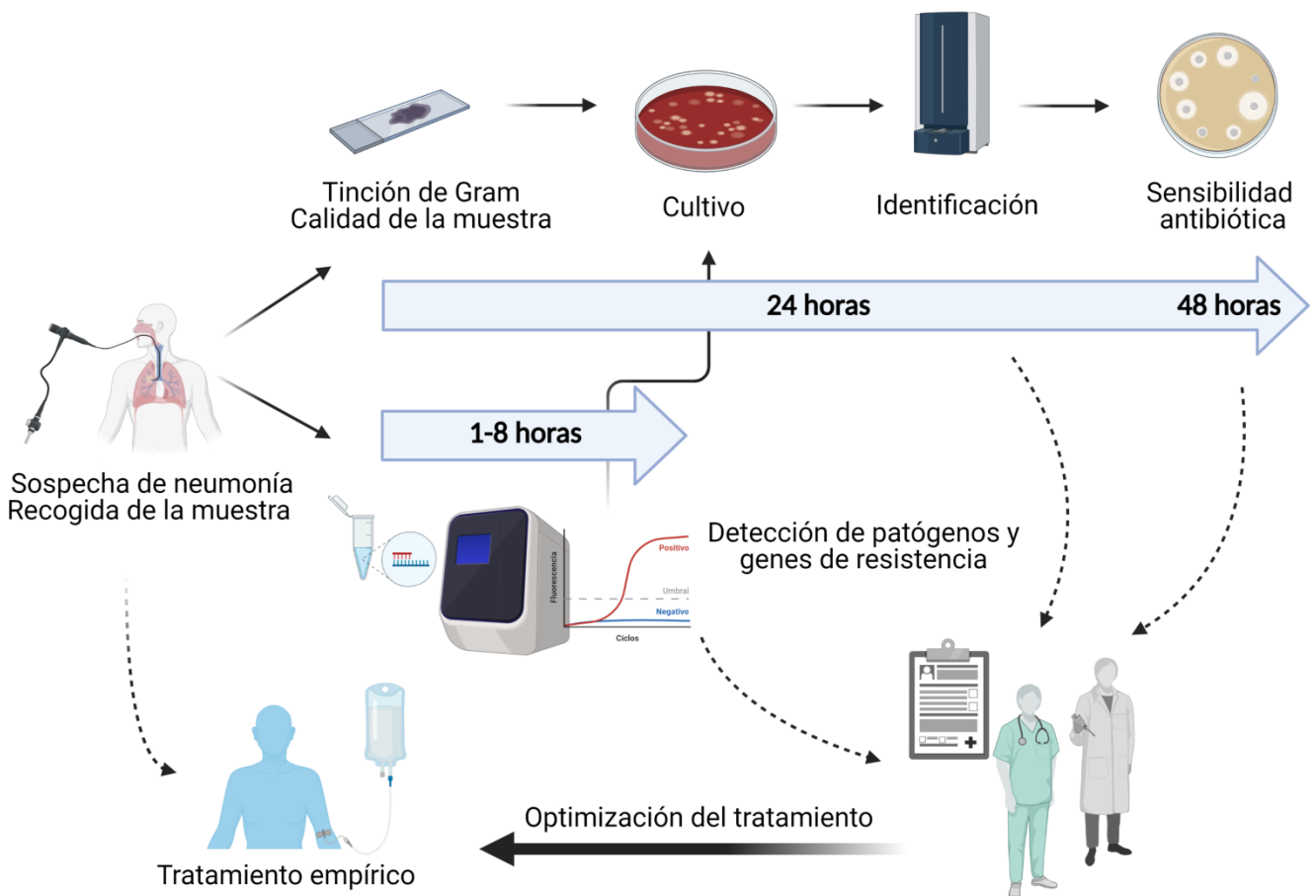
resultado del cultivo como colonización en estos casos. Por lo tanto, todos los resultados LAMP positivos deberían tenerse en cuenta, siempre valorando junto con la tinción de Gram, la calidad de las muestras y la situación clínica del paciente. El cultivo no debe evitarse en ningún caso y la técnica LAMP podría implementarse como complemento para acelerar el diagnóstico de la NIH.

En el caso del trabajo del VHS-1 ([Artículo 2](#)), no se realizó el análisis de correlación entre carga viral y tiempo de positividad, entre otros motivos porque el número de muestras era limitado y porque en algunos casos no disponíamos de la carga viral, si no sólo del valor cualitativo. En la caso del estudio de CMV ([Resultados adicionales 1](#)), se encontró una relación lineal negativa débil, aunque no estadísticamente significativa ($R = -0,32$; $p = 0,19$) entre el número de copias y el tiempo hasta la positividad LAMP. Por otro lado, hemos visto que la sensibilidad de ambos ensayos de LAMP no es tan alta como con la PCR, pero el objetivo principal es detectar a aquellos pacientes con mayor carga viral y peor resultado potencial, por lo que todos lo positivos por LAMP deberían ser considerados como clínicamente valorables.

Sin olvidar que las pruebas rápidas moleculares, tanto para la identificación de bacterias patógenas como para la detección de genes de resistencia se deben considerar pruebas complementarias al cultivo y el antibiograma, el siguiente flujo de trabajo para el diagnóstico de NIH sería una buena alternativa a la práctica actual: cuando la muestra llega al laboratorio de Microbiología Clínica, identificación rápida de las bacterias que causan la NIH mediante LAMP. Si se identifica *A. baumannii* como el patógeno que causa la infección, detección directa de carbapenemasas específicas en *Acinetobacter* spp. usando el test eazyplex® SuperBug Complete A. En el caso de *Enterobacterales*, detección directa de BLEE y carbapenemasas mediante el sistema Xpert Carba-R o eazyplex® SuperBug CRE. Esto permitirá orientar y optimizar la terapia antibiótica de forma más precoz que con las técnicas habituales utilizadas en el laboratorio, lo que probablemente se traduzca en una disminución de la mortalidad. Este ensayo representa el tipo de ventajas que la inversión en diagnósticos moleculares aporta a la práctica clínica ([Figura 10](#)): permite la identificación de mecanismos de resistencia específicos en aproximadamente 45 minutos y, si se incluye la

identificación del patógeno causante mediante LAMP como primer paso (una hora), ambos patógeno y mecanismo de resistencia se puede identificar en menos de dos horas.

Figura 10. Flujo de trabajo en el diagnóstico microbiológico de la neumonía. En el diagnóstico microbiológico de la neumonía, la identificación de los microorganismos causantes se obtiene como mínimo a las 24 horas de la recepción de la muestra en el laboratorio, mientras que para conocer la sensibilidad antibiótica se necesitan unas 48 horas. La introducción de pruebas moleculares permite obtener información rápida en las primeras horas, lo que permitiría un ajuste del tratamiento del paciente de forma precoz. Elaborado con Biorender.com.



Otro campo en el que se ha estudiado mucho en los últimos años y que podría formar parte de este nuevo flujo de trabajo es el de los biomarcadores. Se trata de buscar

Discusión

herramientas objetivas que ayuden al clínico a establecer un diagnóstico precoz, un pronóstico, la gravedad, así como la posible etiología de la neumonía (222,223,285). En este caso, se planteó el uso de la LCN2 como biomarcador de neumonía, ya que había estudios previos que lo avalaban (245–250) y porque el grupo tenía experiencia previa con esta proteína (247,286).

En el estudio en el modelo animal (**Resultados adicionales 2**), a pesar del número limitado de muestras, se pudo observar que las concentraciones de LCN2 son más altas en LBA que en suero, lo cual nos puede indicar que es una mejor muestra para medir este biomarcador. Por otro lado, se pudo analizar la cinética de este biomarcador en un modelo en el que las condiciones estaban controladas y no había factores externos que pudieran influir en el experimento. Se observó un aumento progresivo de la concentración de LCN2 en los animales con infección por *S. aureus* y *P. aeruginosa* en plasma y LBA, mientras que esta tendencia no se observó en el grupo control. Sería muy interesante reproducir este mismo estudio en pacientes en UCI con NAVM, aunque debido a las complejas características de estos pacientes es complicado conseguir grupos tan bien caracterizados.

Por otro lado, aunque se ha visto que el papel de la LCN2 para predecir la etiología bacteriana en la NAC en pacientes adultos no aporta mucho más que la CRP, sí que puede tener un papel prometedor en predecir la severidad y pronóstico de estos pacientes (**Resultados adicionales 3**). Se trata de un estudio con un número importante (N=130) de pacientes muy bien caracterizados en los que además se han podido analizar otros biomarcadores, como son la CRP, el recuento de leucocitos y el recuento de linfocitos en plasma. Estudios previos obtuvieron concentraciones plasmáticas de LCN2 significativamente más altas en niños con NAC bacteriana (247), pero estos hallazgos no fueron confirmados por otros estudios (287). Xu *et al.* (250) realizaron un trabajo en el que la concentración plasmática de LCN2 también discriminaba infecciones virales y bacterianas en pacientes con infección aguda de distinta localización, incluyendo tanto niños como adultos, con mayor sensibilidad y especificidad que la CRP. De manera similar, Yu *et al.* (288) encontraron resultados similares en 110 pacientes adultos con infecciones del tracto respiratorio superior e inferior. En el caso de este estudio (**Resultados adicionales 3**), que

incluyó solo a pacientes adultos con NAC, la concentración de LCN2 fue similar a la CRP para predecir la etiología de la NAC. Con respecto a la neumonía neumocócica, la concentración plasmática de LCN2 se correlacionó con la positividad del hemocultivo, así como con la positividad de la qPCR y la carga bacteriana en sangre. Desafortunadamente, esto no se observó con pruebas menos invasivas, como la qPCR en frotis nasofaríngeo o la detección de antígeno en orina.

En consonancia con estudios previos (287,289,290), se encontró que los pacientes con una NAC más grave al ingreso en urgencias, medido por dos índices de gravedad diferentes (PSI y CURB-65), tenían concentraciones plasmáticas más elevadas de LCN2. Por el contrario, esta relación no se observó para la CRP, el recuento de leucocitos ni el recuento de linfocitos. El valor pronóstico de la LCN2 también ha sido evaluado previamente, tanto para predecir el ingreso en la UCI como la mortalidad en pacientes hospitalizados con neumonía (245). De manera similar, se observó que la concentración plasmática de LCN2 fue significativamente mayor en aquellos pacientes que requirieron ingreso en UCI. No se pudo analizar la utilidad de LCN2 como biomarcador de mortalidad intrahospitalaria o mortalidad a los 30 días porque solo un paciente falleció en el hospital y ninguno durante los 30 días de seguimiento.

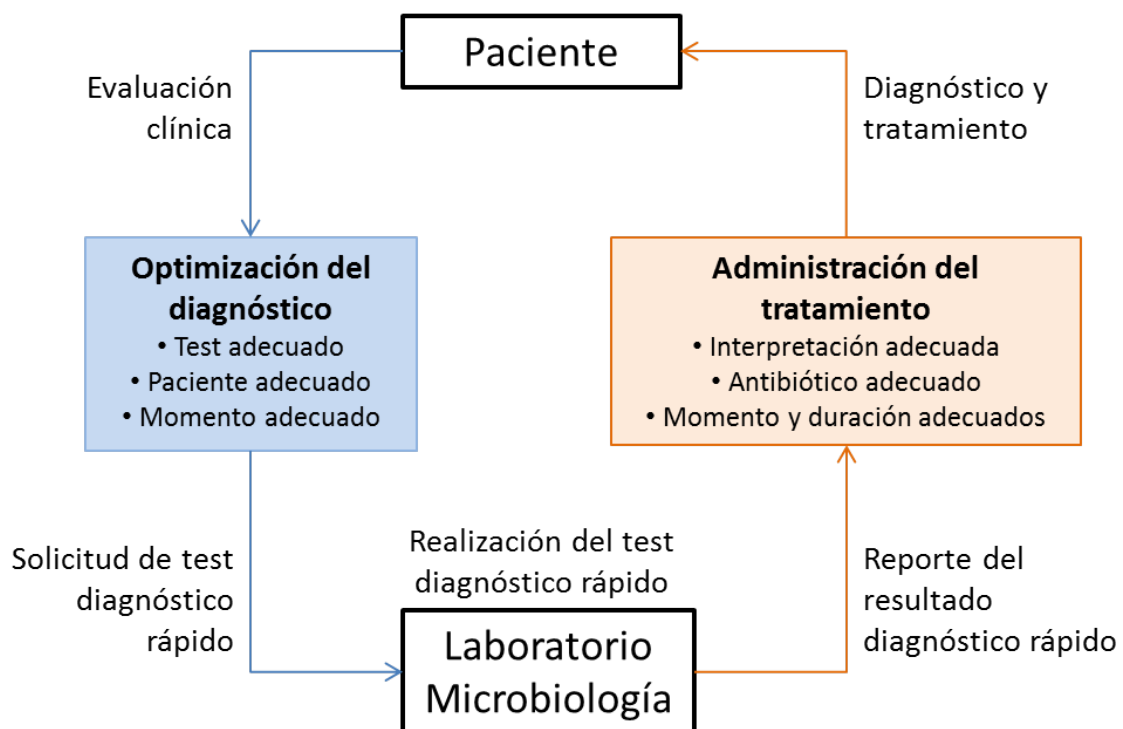
Desafortunadamente, sólo se pudo medir la concentración de LCN2 en un solo punto temporal, al ingreso, lo que hace imposible evaluar la cinética de este biomarcador durante el curso de la infección. Por otro lado, si bien es verdad que es un número limitado aunque importante de pacientes, éstos formaban parte de una cohorte muy bien caracterizada. Por otro lado, cabe destacar que la técnica empleada en este estudio está completamente automatizada y además permite realizar determinaciones en muestras individualizadas con un tiempo de respuesta de 30 minutos. Esto hace que este método sea adecuado para su uso en el laboratorio de urgencias de Microbiología, a diferencia de los métodos basados en enzimo-inmunoanálisis, que son mucho más laboriosos y lentos.

En definitiva, el laboratorio de Microbiología Clínica se encuentra en medio de una revolución diagnóstica. Ahora mismo existe una brecha entre poco diagnóstico y mucho tratamiento. Sin embargo, las nuevas tecnologías de diagnóstico molecular y la búsqueda de

Discusión

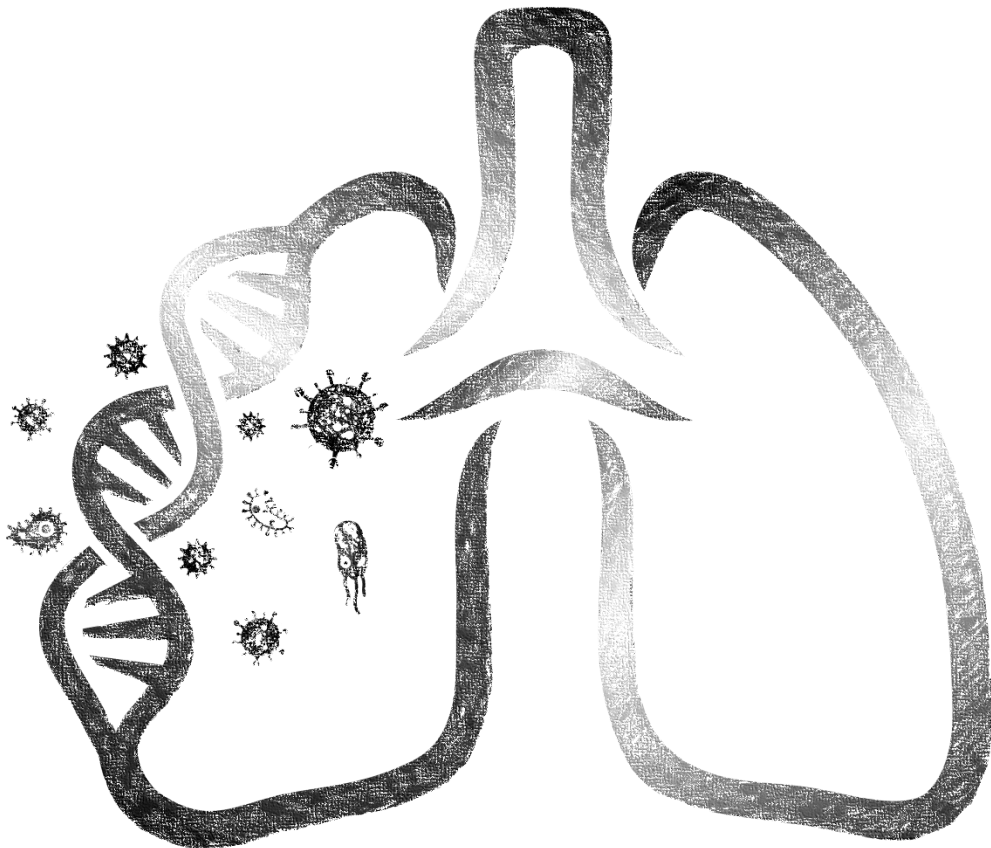
nuevos biomarcadores tienen el potencial de transformar el laboratorio de Microbiología moderno y la atención de pacientes con sospecha de infecciones al proporcionar diagnósticos microbiológicos más rápidos que permitan un tratamiento más adecuado. Sin embargo, estos avances tecnológicos conllevan desafíos prácticos para el laboratorio y para los clínicos. Esto genera una gran oportunidad para la implementación de Programas de Optimización del Uso de los Antibióticos (PROA), que tiene como objetivo seleccionar la prueba adecuada para el paciente adecuado, generando resultados precisos y clínicamente relevantes en el momento adecuado para influir de manera óptima en la atención clínica y conservar los recursos de atención médica (291) (Figura 11).

Figura 11. Implementación de las técnicas rápidas de diagnóstico de enfermedades infecciosas en el ámbito clínico para optimizar el diagnóstico y la administración de antimicrobianos. Adaptado de (291).



El abordaje del diagnóstico de la neumonía debe realizarse a través de un interrogatorio que tenga en cuenta tanto la microbiota respiratoria como la correspondiente respuesta del huésped. En los últimos años, tanto la metagenómica microbiana como la transcriptómica (huésped y microorganismos) ha evolucionado mucho y los costes y tiempos de realización de estas técnicas se han reducido considerablemente. Por ello, no es de extrañar, que en un futuro no muy lejano las nuevas tecnologías cambien el paradigma de diagnóstico de la neumonía: técnicas de secuenciación de tercera generación para la identificación de patógenos causantes de neumonía (153,292,293), tecnologías de cuantificación ultrasensibles y rápidas que prometen proporcionar concentraciones absolutas de índices inflamatorios y metabólicos clave del huésped (294); o medición de marcadores en aire exhalado, no invasivo y capaz de identificar no solo la presencia bacteriana sino también su función y virulencia mediante la detección de metabolitos volátiles así como índices metabólicos de la respuesta del huésped (294).

CONCLUSIONES



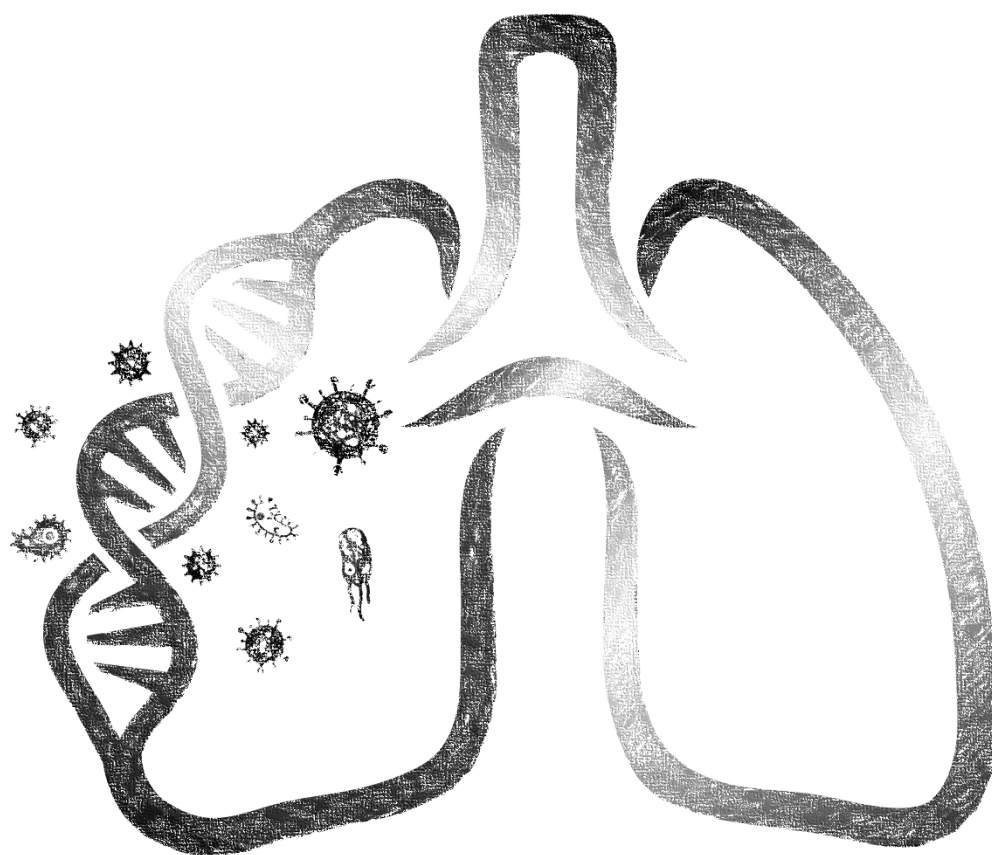
6. Conclusiones

1. La neumonía es una infección con una elevada morbi-mortalidad en todo el mundo.
2. El diagnóstico etiológico de la neumonía es fundamental para un buen manejo del paciente.
3. Las técnicas moleculares supusieron un gran avance para el diagnóstico de la neumonía, especialmente en la neumonía viral, pero son técnicas todavía caras en general.
4. En el caso de las pruebas moleculares rápidas sindrómicas, se debe realizar una buena selección del paciente a quien se realiza.
5. La técnica de amplificación isotérmica tipo LAMP ha aumentado sus aplicaciones en el campo de la Microbiología Clínica de forma exponencial en los últimos años.
6. La morbi-mortalidad asociada sugiere que el cribado de citomegalovirus sería necesario en los pacientes de Unidad de Cuidados Intensivos con sospecha de infección respiratoria.
7. La técnica LAMP puede ser usada para detectar los principales microorganismos causantes de neumonía intrahospitalaria (bacterias y virus) de forma barata, rápida, sensible y específica.
8. El sistema eazyplex® SuperBug CRE es una buena herramienta para la detección de diferentes carbapenemasas, así como BLEE tipo CTX-M en *Enterobacterales* con un tiempo de respuesta rápido.
9. El sistema eazyplex® SuperBug complete A permite la amplificación y detección de genes de resistencia a los carbapenémicos en cepas de *Acinetobacter* spp. de forma rápida y fiable.

Conclusiones

- 10.** Los sistemas eazyplex® SuperBug CRE, eazyplex® SuperBug complete A y Xpert Carba-R son eficaces para la detección rápida de las carbapenemasas y BLEE más prevalentes entre las cepas de importancia clínica causantes de neumonía nosocomial directamente de muestra clínica y debería considerarse su uso en rutina.
- 11.** En condiciones de alta concentración de bacterias, se puede evitar la extracción de los ácidos nucleicos previa a la LAMP y, por lo tanto, reducir el tiempo de respuesta.
- 12.** Son necesarios estudios de costo-efectividad para demostrar la utilidad de la LAMP como método diagnóstico de neumonía que permita una implementación rápida de medidas de control y toma de decisiones terapéuticas.
- 13.** Los niveles de lipocalina-2 aumentan en los animales que desarrollan neumonía asociada a la ventilación mecánica.
- 14.** La capacidad de la lipocalina-2 como biomarcador para discriminar la etiología de la neumonía adquirida en la comunidad es limitada, pero su concentración se relaciona con la gravedad y el ingreso en la Unidad de Cuidados Intensivos en pacientes adultos con neumonía adquirida en la comunidad.

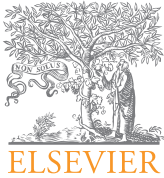
ANEXOS



7. Anexos

Anexo 1

Vila J, Zboromyrska Y, Vergara A, Alejo-Cancho I, Rubio E, Álvarez-Martínez MJ, Puig de la Bellacasa J, Marcos MA. *Métodos moleculares de diagnóstico de infecciones respiratorias. ¿Ha cambiado el esquema diagnóstico?* *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2016;34(3):40-46.



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



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

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

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

RESUMEN

Palabras clave:

Infecciones respiratorias
Bacterias
Virus
Hongos
Diagnóstico rápido

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

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

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

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

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

ABSTRACT

Keywords:

Respiratory tract infections
Bacteria
Virus
Fungi
Rapid diagnosis

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

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

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

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

*Autor para correspondencia.

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

Introducción

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

Según la Organización Mundial de la Salud¹, las infecciones respiratorias bajas siguen siendo una de las causas más frecuentes de mortalidad en todo el mundo, de ahí que el diagnóstico precoz sea fundamental. Tradicionalmente, el diagnóstico microbiológico de este tipo de infecciones se ha basado en lo siguiente: el aislamiento de bacterias, levaduras y hongos filamentosos mediante diversos medios de cultivo; el aislamiento de virus mediante cultivo celular, y la detección antigénica o de anticuerpos (pruebas serológicas) mediante inmunofluorescencia directa o enzimoimmunoensayo.

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

Detección de bacterias

En el caso de la neumonía adquirida en la comunidad destacan las infecciones por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis* y los microorganismos causantes de neumonía atípica como *Legionella* spp., *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae* y *Coxiella burnetii*². En el caso de la neumonía nosocomial prevalecen más las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *S. aureus* y diversas enterobacterias³ que con frecuencia presentan una mayor tasa de resistencias a los antimicrobianos⁴.

El esquema diagnóstico de referencia utilizado para identificar bacterias causantes de infecciones respiratorias sigue siendo el cultivo convencional semicuantitativo previa tinción de Gram a partir de la muestra directa, seguido de identificación y realización de antibiograma de los microorganismos patógenos⁵. Este proceso presenta una baja sensibilidad (especialmente si la muestra se ha tomado después de iniciar un tratamiento antibiótico), además de dificultad para diferenciar entre colonización e infección. Otro inconveniente es que el proceso requiere un tiempo mínimo de 2 días. En este período, muchos pacientes se tratan de forma empírica con antibióticos de amplio espectro. El tratamiento empírico puede ser inadecuado y aumentar la morbimortalidad de los pacientes. Por lo tanto, con el fin de disminuir el tiempo de identificación y orientar al clínico hacia un tratamiento adecuado lo antes posible, son necesarios métodos de diagnóstico rápido.

Los métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizan de forma rutinaria en algunos laboratorios de microbiología, principalmente para la identificación de microorganismos difíciles de cultivar o de lento crecimiento, como son los microorganismos causantes de neumonía atípica⁶. Una novedad en el diagnóstico molecular de infecciones respiratorias es el uso del sistema automatizado basado en la PCR a tiempo real, GeneXpert, a partir de secreciones del tracto respiratorio inferior para identificar *S. aureus* y su perfil de resistencia a meticilina en un período de 1 h. En un estudio reciente⁷ se examinaron 135 aspirados traqueales de pacientes con sospecha de neumonía asociada a ventilación mecánica en los que se observaron estafilococos en racimo en la tinción de Gram.

Tabla 1
Principales microorganismos causantes de neumonía

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

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

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

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

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

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

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

Recientemente ha emergido un nuevo grupo de técnicas moleculares basadas en la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos⁸. A diferencia de las PCR convencionales, en las que son necesarios una serie de ciclos de cambios de temperatura para que se produzca la amplificación de los ácidos nucleicos, estas técnicas permiten la amplificación a una temperatura constante. Las técnicas de amplificación isotérmica presentan sensibilidades y especificidades similares a las de la PCR, con la ventaja de requerir una instrumentación más sencilla y barata, por lo que podrían utilizarse en países de baja renta. Se han realizado numerosos ensayos que demuestran que estas técnicas son válidas para la identificación de los principales patógenos respiratorios^{9,10}. En un estudio reciente, Zhang et al¹¹ aplicaron la

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

Otro reto para el diagnóstico rápido de las infecciones respiratorias es la detección precoz del perfil de resistencias a antibióticos de las diversas bacterias¹². El mayor obstáculo del uso de técnicas moleculares en la detección de resistencias es la discrepancia entre fenotipo y genotipo. Continuamente se descubren nuevos mecanismos de resistencia, con lo que la posible presencia de mecanismos desconocidos puede dar lugar a resultados falsos negativos mediante técnicas moleculares. Un problema adicional es la detección de marcadores genotípicos que fenotípicamente no comportan una resistencia clínicamente significativa. Esta complejidad es mucho mayor en bacterias gramnegativas que en grampositivas, ya que presentan más variedad de genes implicados en estos mecanismos. A pesar de los

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

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

Detección de hongos

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

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

En consecuencia, las técnicas de diagnóstico molecular para la detección de hongos se emplean cada vez más y su desarrollo está en pleno auge. Estas técnicas posibilitan un diagnóstico rápido y certero, que repercute de forma directa en la instauración de un correcto tratamiento para los pacientes. Son técnicas que pueden aplicarse directamente a la muestra clínica o a la colonia obtenida del cultivo. Numerosos artículos han revisado la situación actual de estas nuevas técnicas de diagnóstico molecular frente a otras técnicas de diagnóstico clásico¹⁵⁻¹⁷.

El empleo de técnicas moleculares sobre cepas obtenidas de un cultivo permite adelantar el diagnóstico de especie en algunos casos. Si bien las características morfológicas (micro y macroscópicas) permiten hacer una identificación preliminar del organismo causante, en muchas ocasiones la identificación de la especie definitiva requiere técnicas de PCR y secuenciación, ya que las características fenotípicas no siempre son suficientes para distinguir entre las diferentes especies¹⁸. Es importante realizar una correcta identificación de la especie, ya que se ha observado la existencia de especies crípticas de interés patológico que se aíslan cada vez con más frecuencia y cuya sensibilidad a los antifúngicos es, en algunos casos, diferente a la de otras especies morfológicamente idénticas o muy parecidas.

La realización de técnicas moleculares directamente sobre la muestra clínica puede permitir la obtención de un diagnóstico en cuestión de horas, frente a los días o semanas que se demora por los métodos convencionales (en caso de que se aísla la cepa) o que sea el único método (en el caso de hongos no viables). Sin embargo, a pesar de la gran expansión de estas técnicas, no se encuentran dentro de los criterios de diagnóstico de las enfermedades fúngicas definidos por la European Organization for Research and Treatment of Cancer/ Mycoses Study Group (EORTC/MSG), debido principalmente a su falta de estandarización¹⁹.

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

todos de extracción de ADN para sangre completa y suero que han permitido la obtención de resultados similares en diferentes laboratorios. Esto puede permitir que las técnicas moleculares se incluyan como criterio diagnóstico en las próximas guías de la EORTC/MSG. Sin embargo, aún no hay criterios estandarizados similares para el procesamiento de muestras respiratorias²⁰.

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

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

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

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

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

Detección de virus

Los virus respiratorios son la causa más frecuente de infección del tracto respiratorio superior, pero también están implicados en cuadros más graves como bronquiolitis y neumonía²¹. Se han descrito más de 200 virus capaces de producir infección respiratoria. Los más frecuentes son: virus de la gripe A, virus de la gripe B, virus parainfluenza 1-4, virus respiratorio sincitial, metapneumovirus humano, enterovirus, rinovirus, coronavirus, poliomavirus WU y KI, bocavirus humano y adenovirus (tabla 1). Sin embargo, en determinados pacientes (fundamentalmente inmunodeprimidos) no hay que olvidar

otros virus asociados a infección respiratoria, como el virus de la varicela zóster, citomegalovirus, virus herpes simple, virus herpes 6 y 7, hantavirus, mimivirus y virus del sarampión²². Generalmente, un mismo cuadro respiratorio puede ser causado por virus diferentes, por lo que el diagnóstico etiológico definitivo deberá confirmarse mediante técnicas microbiológicas.

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

La PCR es la técnica más empleada, tanto a tiempo final como a tiempo real^{25,26}. La PCR a tiempo real presenta una mayor sensibilidad; hace posible la amplificación y detección simultánea del producto de PCR y permite la cuantificación del material genético en la muestra. Aunque por ahora la información acerca del significado de la carga viral es limitada, se ha visto que puede estar relacionada con la gravedad del paciente²⁷, su evolución y respuesta al tratamiento²⁸, y que incluso podría permitir diferenciar entre colonización e infección²⁹.

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

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

Los métodos moleculares permiten ir más allá de la identificación del virus responsable del cuadro, ya que la secuenciación del mismo ayuda a llevar a cabo su caracterización y genotipado, a realizar estudios de epidemiología molecular y a identificar resistencias a determinados antivirales³².

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

En los últimos años se han realizado estudios sobre el impacto de las técnicas moleculares en el manejo y pronóstico de pacientes con infecciones respiratorias, así como de coste-efectividad de su implantación en los laboratorios de microbiología clínica. Rogers et al³³ publicaron un estudio evaluando el impacto de la incorporación de FilmArray Rapid Respiratory Panel (BioFire Diagnostics; Salt Lake City, Utah, Estados Unidos) en el pronóstico de niños ingresados por una infección respiratoria aguda. En el estudio se demostró que la implementación de esta técnica reducía de manera significativa la duración de la estancia hospitalaria, así como el tiempo del aislamiento y la duración del tratamiento antibiótico, siempre y cuando los resultados

estuviesen disponibles en las primeras 4 h. Hay que destacar que solo se tomaron en cuenta los resultados de la detección de virus respiratorios, ya que la detección de los 3 patógenos bacterianos incluidos en el panel (*M. pneumoniae*, *B. pertussis* y *C. pneumoniae*) no se había validado en el momento del estudio. En otro estudio publicado, los autores evaluaron el impacto de una técnica molecular, PCR-based Unyvero Pneumonia (Curetis AG, Holzgerlingen, Germany), en el manejo de los pacientes con neumonía nosocomial grave¹³. Esta técnica permite la identificación de 18 patógenos bacterianos y de *P. jirovecii*, junto con 22 marcadores de resistencia. El ensayo Unyvero Pneumonia no solo redujo el tiempo hasta la obtención del resultado en comparación con el cultivo convencional (4 frente a 48-96 h), sino que también detectó un número importante de infecciones múltiples (55,1 frente a 8,2%). En cuanto al impacto sobre el manejo de pacientes, el tratamiento empírico inicial fue cambiado en el 67,3% de los casos basándose en los resultados del ensayo, incluida la detección de los genes de resistencia.

El incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos aumenta la probabilidad de que los tratamientos empíricos habituales sean inefectivos, lo que produce un retraso en el inicio de un tratamiento antibiótico apropiado³⁴. En los últimos años se han publicado numerosos estudios que demuestran que el retraso en establecer un tratamiento antibiótico apropiado aumenta la morbimortalidad de los pacientes con neumonía^{35,36}, aunque, indirectamente, estos estudios confirman la importancia del diagnóstico microbiológico rápido que se puede proporcionar mediante técnicas moleculares y el impacto que dichas técnicas puede tener para el manejo adecuado de los pacientes, especialmente en la neumonía intrahospitalaria grave.

Otro aspecto que hay que tener en cuenta es la detección de múltiples patógenos. La frecuencia de infecciones mixtas detectadas ha crecido de manera notable con la implementación de las técnicas moleculares. Aunque se ha demostrado el impacto de la coinfección del virus de la gripe A (H1N1) y patógenos bacterianos (p. ej., *S. aureus* y *S. pneumoniae*) en la mortalidad³⁷, el papel de las infecciones mixtas con otros virus respiratorios no está tan claro. En cuanto a la neumonía con más de un patógeno bacteriano detectado, se ha demostrado que la infección polimicrobiana es un factor de riesgo para el tratamiento empírico inapropiado, cuyas consecuencias ya se han discutido previamente³⁸.

Aparte de las técnicas moleculares que permiten la detección cualitativa de los patógenos respiratorios, recientemente se han publicado estudios que resaltan la importancia de la cuantificación de ARN/ADN detectado, que permitiría la discriminación entre colonización frente a infección³⁹ o contaminación con flora del tracto respiratorio superior⁴⁰.

Respecto a los estudios de coste-efectividad de las pruebas moleculares, Leone et al⁴¹ evaluaron el impacto económico del uso de Cepheid Xpert real-time PCR (Cepheid; Sunnyvale, California, Estados Unidos) para el diagnóstico rápido de *S. aureus* resistente a la metilina (SARM) en las muestras respiratorias (lavado broncoalveolar [BAL] y mini-BAL) de los pacientes con sospecha de neumonía asociada a ventilación mecánica. Para ello, se consideraron 2 posibilidades de tratamiento antibiótico empírico: uno más caro (150 euros/día en pacientes con fallo renal) y otros más económicos (50 euros/día). El coste del test fue de 45 euros. Los autores demostraron que, en el caso del tratamiento empírico de 150 euros/día, la prueba era coste-efectiva independientemente de la prevalencia de SARM y que, en el caso del tratamiento de 50 euros/día, el test era coste-efectivo si la prevalencia era > 25%. En 2011, Harris et al⁴² publicaron un estudio de coste-efectividad en el que compararon 33 diferentes estrategias para diagnosticar la neumonía por *P. jirovecii* en los pacientes positivos para el VIH en Sudáfrica. En este estudio se demostró que cualquiera de las técnicas moleculares evaluadas (PCR a tiempo final, PCR anidada, PCR a tiempo real) para la detección de *P. jirovecii* en una muestra respiratoria menos invasiva (esputo) representa una opción más coste-efectiva (26-51 dólares por año de vida ganado y con

una tasa de pacientes tratados con éxito de 77-90%) en comparación con otras estrategias diagnósticas evaluadas. Recientemente, Dugas et al⁴³ han publicado un análisis de coste-efectividad en el que se evalúan diferentes estrategias del manejo de los pacientes atendidos en el departamento de urgencias con una infección respiratoria aguda durante la temporada de gripe según su prevalencia. Durante las prevalencias más bajas de gripe (3-7%), la opción más coste-efectiva fue tratar a los pacientes según el resultado de una técnica rápida de PCR. Sin embargo, en prevalencias más altas (> 7%), la mejor estrategia era tratar a todos los pacientes. No obstante, esta última opción puede representar un factor de riesgo para el desarrollo de resistencias a los antivirales que debe evaluarse.

Futuro de las técnicas moleculares en el laboratorio de microbiología clínica

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

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

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

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

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

Anexo 2

Certificados de presentación de comunicaciones a congresos.

CERTIFICADO DE PARTICIPACIÓN

El Presidente del Comité Organizador del **XX Congreso SEIMC 2016**, en nombre de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

CERTIFICA QUE:

A. Vergara, C. Cilloniz, J. Tejero, A. Cervilla, I. Alejo, C. Lucena, E. Rubio, A. Fasanella, A. Torres, M.A. Marcos

han realizado la presentación POSTER de la comunicación con título:

“Detección de citomegalovirus en lavados broncoalveolares de pacientes críticos.”

en el XX Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, celebrado en Barcelona, del 26 al 28 de mayo de 2016.

Y para que conste se expide el presente certificado en Barcelona a 28 de mayo de 2016.




Dr. José María Miró Meda
Presidente del Comité Organizador

27th **ECCMID**

Vienna, Austria

22 – 25 April 2017

The congress of  ESCMID

Session: P091 Clinical epidemiology of viral infections

Category: 1c. Influenza and respiratory viruses

25 April 2017, 12:30 - 13:30

P1901

Evaluation of a LAMP (loop-mediated isothermal amplification) assay as a screening tool to detect CMV in critically ill patients

Andrea Vergara Gomez^{*1}, Izaskun Alejo-Cancho², Anna Cervilla³, Mireia Navarro⁴, Cristina Rodriguez⁵, Maria Angeles Marcos³

¹*Hospital Clínic; Microbiology*

²*Hospital Clínic I Provincial de Barcelona; Microbiology*

³*Hospital Clínic; Microbiology*

⁴*Isglobal, Hospital Clínic-Universitat de Barcelona; Department of Clinical Microbiology*

⁵*Hospital Clínic I Provincial de Barcelona*

14 May 2018

To whom it may concern:

CONFIRMATION OF PRESENTATION AT ECCMID 2018

We hereby confirm that the following abstract has been submitted, accepted and presented at the 28th ECCMID, the European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, which took place in Madrid, Spain, 21 – 24 April 2018.

Title: Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid detection of pathogenic bacteria in bronchoalveolar lavage specimens

Abstract Authors: A. Vergara Gomez, A. Cruells, M. López, J. Puig de la Bellacasa, F. Marco Reverte, J. Vila

Presenter: Andrea Vergara Gomez

Session Title: Respiratory infection: molecular diagnosis, take the power

Presentation Type: Paper Poster Session

Presentation Number: P0555

Yours sincerely,



Winfried V. Kern
ECCMID 2018 Programme Director

ESCMID European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

ESCMID Executive Committee M. Poljak, President, Ljubljana, SI; M. Akova, Past-President and Communication Officer, Ankara, TR; J. Rodriguez-Baño, President-elect and Secretary General, Seville, ES; A. Friedrich, Treasurer, Groningen, NL; M. Sanguinetti, Professional Affairs Officer Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Rome, IT; E. Tacconelli, Education Officer, Tübingen, DE; A. Zinkernagel, Scientific Affairs Officer, Zurich, CH

Ad hoc members Ch. Giske, EUCAST Chairperson, Stockholm, SE; Michel Drancourt, NMNI Editor-in-Chief, Marseille, FR; W. Hope, ESCMID Guidelines Director, Liverpool, UK; L. Leibovici, CMI Editor-in-Chief, Petah-Tiqva, IL; W. Kern, ECCMID Programme Director, Freiburg, DE;



CERTIFICADO DE PARTICIPACIÓN

La Presidenta del Comité Organizador del **XXII Congreso SEIMC 2018**, en nombre de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

CERTIFICA QUE:

A. Vergara, R. Vendrell, I. Alejo, A. Cruells, A. Cervilla, C. Rodríguez, J. Vila, M.A. Marcos

han realizado la presentación **ORAL** de la comunicación con título:

“Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) como técnica de detección del virus herpes simple en lavado broncoalveolar”

en el XXII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, celebrado en Bilbao, del 24 al 26 de mayo de 2018.

Y para que conste se expide el presente certificado en Bilbao a 26 de mayo de 2018.

Dra. Josefa Muñoz Sánchez
Presidenta del Comité Organizador

Basel, 9th May 2019

To whom it may concern:

CONFIRMATION OF PRESENTATION AT ECCMID 2019

We hereby confirm that the following abstract was submitted, accepted and presented at the 29th ECCMID, the European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, which took place in Amsterdam, Netherlands, 13 – 16 April 2019.

Title:

Evaluation
of a loop-mediated isothermal amplification assay to detect
extended-spectrum-beta-lactamase and/or carbapenemase-producing
Enterobacteriaceae and Acinetobacter directly
from bronchoalveolar lavage fluid

Abstract Authors: J. Moreno Morales, A. Vergara, J. Vila

Presenter: Javier Moreno Morales

Session Title: Molecular methods for carbapenemase detection

Presentation Type: Paper Poster Session

Presentation Number: P1245

Yours sincerely,



Winfried V. Kern
ECCMID 2019 Programme Director

ESCMID European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

ESCMID Executive Committee: J. Rodriguez-Banõ, President, Seville, ES; M. Poljak, Immediate Past-President and Publications Officer, Ljubljana, SI; M. Sanguinetti, President-elect and Secretary General, Rome, IT; A. Friedrich, Treasurer, Groningen, NL; E. Cambau, Professional Affairs Officer, Paris, FR; E. Tacconelli, Guidelines Officer, Verona, IT; A. Zinkernagel, Scientific Affairs Officer, Zurich, CH; Ö. Ergönül, Education and Communications Officer, Istanbul, TR; Ad hoc Members: Ch. Giske, EUCAST Chairperson, Stockholm, SE; L. Scudeller, ESCMID Guidelines Director, Pavia, IT; L. Leibovici, *CMI* Editor-in-Chief, Petah-Tiqva, IL; W. Kern, ECCMID Programme Director, Freiburg, DE

CERTIFICADO DE PARTICIPACIÓN

El Presidente del Comité Científico del **XXIII Congreso SEIMC 2019**, en nombre de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

CERTIFICA QUE:

A. Vergara Gómez, C. Casals-Pascual, A. Motos, L. Fernández-Barat, A. Torres, J. Vila

han realizado la presentación **ORAL** de la comunicación con título:

“Evaluación de la lipocalina-2 como biomarcador de neumonía asociada a ventilación mecánica en un modelo animal”

en el XXIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, celebrado en Madrid, del 23 al 25 de mayo de 2019.

Y para que conste se expide el presente certificado en Madrid a 25 de mayo de 2019.



Dr. Rafael Cantón
Presidente del Comité Científico

CERTIFICADO DE PARTICIPACIÓN

El Presidente del Comité Científico del **XXIII Congreso SEIMC 2019**, en nombre de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

CERTIFICA QUE:

A. Vergara Gómez, L. Boix, D. Martínez, E. Padilla, E. Calbo, J. Pérez, C. Casals-Pascual, J. Vila

han realizado la presentación **ORAL** de la comunicación con título:

“Evaluación de la lipocalina-2 en plasma como biomarcador de neumonía adquirida en la comunidad bacteriana frente vírica”

en el XXIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, celebrado en Madrid, del 23 al 25 de mayo de 2019.

Y para que conste se expide el presente certificado en Madrid a 25 de mayo de 2019.



Dr. Rafael Cantón
Presidente del Comité Científico



30th **ECCMID**

Abstract Book 2020

European Congress of
Clinical Microbiology
and Infectious Diseases

Abstracts 2020

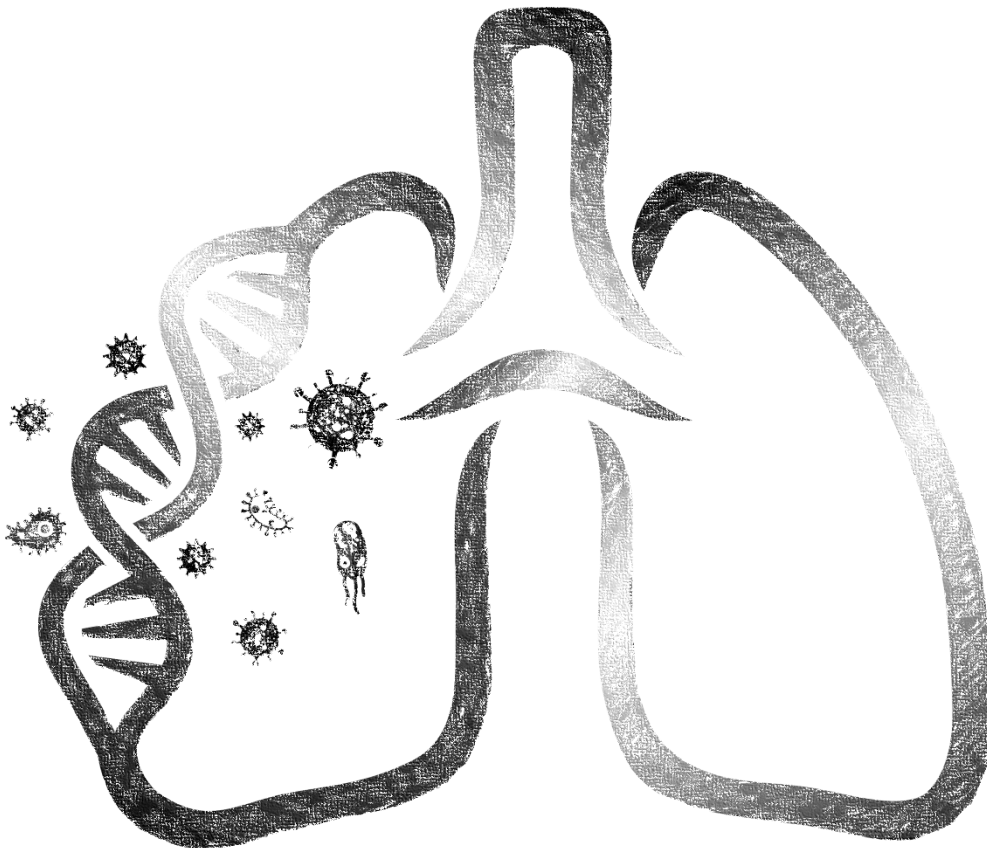


Abstract 6711

Evaluation of plasma lipocalin-2 as a biomarker of community-acquired pneumonia

Andrea Vergara^{*1}, Lucía Boix-Palop², Emma Padilla³, Esther Calbo^{2,4}, Ana Blanco Suárez³, Pepita Perez³, Jordi Vila Estape⁵, Climent Casals-Pascual⁵

REFERENCIAS



8. Referencias

1. Sattar SBA, Sharma S. Bacterial Pneumonia [Internet]. StatPearls Publishing; 2020 [citado 17 de febrero de 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513321/>
2. Kollef MH, Shorr A, Tabak YP, Gupta V, Liu LZ JR. Epidemiology and Outcomes of Health-Care-Associated Pneumonia: Results From a Large US Database of Culture-Positive Pneumonia. *Chest*. 2005;128(6):3854-62.
3. Polverino E, Dambrava P, Cillóniz C, Balasso V, Marcos MA, Esquinas C, Mensa J, Ewig S TA. Nursing Home-Acquired Pneumonia: A 10 Year Single-Centre Experience. *Thorax*. 2010;65(4):354-9.
4. Metlay JP, Waterer GW, Long AC, Anzueto A, Brozek J, Crothers K, et al. Diagnosis and Treatment of Adults with Community-acquired Pneumonia. An Official Clinical Practice Guideline of the American Thoracic Society and Infectious Diseases Society of America. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019;200(7):e45-67.
5. Ewig S, Klapdor B, Pletz MW, Rohde G, Schütte H, Schaberg T, Bauer TT WTC study group. Nursing-home-acquired Pneumonia in Germany: An 8-year Prospective Multicentre Study. *Thorax*. 2012;67(2):132-8.
6. Chalmers JD, Rother C, Salih W ES. Healthcare-associated Pneumonia Does Not Accurately Identify Potentially Resistant Pathogens: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Infect Dis*. 2014;58(3):330-9.
7. World Health Organization. The top 10 causes of death [Internet]. [citado

Referencias

- 7 de marzo de 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
8. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380(9859):2095-128.
 9. McAllister DA, Liu L, Shi T, Chu Y, Reed C, Burrows J, et al. Global, regional, and national estimates of pneumonia morbidity and mortality in children younger than 5 years between 2000 and 2015: a systematic analysis. *Lancet Glob Heal*. 2019;7(1):e47-57.
 10. Dadonaite B, Roser M. Pneumonia [Internet]. *Pneumonia*. 2018 [citado 22 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://ourworldindata.org/pneumonia#licence>
 11. Welte T, Köhnlein T. Global and Local Epidemiology of Community-Acquired Pneumonia: The Experience of the CAPNETZ Network. *Semin Respir Crit Care Med*. 2009;30(02).
 12. Falguera M, Gudiol F, Sabriá M, Álvarez-Lerma F CE. Infecciones en el tracto respiratorio inferior [Internet]. [citado 22 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosclinicos/seimc-procedimientoclinicoi.pdf>
 13. Rivero-Calle I, Pardo-Seco J, Aldaz P, Vargas DA, Mascarós E, Redondo E, et al. Incidence and risk factor prevalence of community-acquired pneumonia in adults in primary care in Spain (NEUMO-ES-RISK project).

- BMC Infect Dis. 2016;16(1).
14. Menéndez R, Torres A, Aspa J, Capelastegui A, Prat C, Rodríguez de Castro F. Neumonía adquirida en la comunidad. Nueva normativa de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR). Arch Bronconeumol. 2010;46(10):543-58.
 15. Calvo JBC, Peinado MAM, Palomo AO, Bellacasa JP de la. Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior [Internet]. Procedimientos en Microbiología Clínica. SEIMC. 2007 [citado 22 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimient osmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia25.pdf>
 16. Ferrer M, Torres A. Epidemiology of ICU-acquired Pneumonia. Curr Opin Crit Care. 2018;24(5):325-31.
 17. Torres A, Niederman MS, Chastre J, Ewig S, Fernandez-Vandellos P, Hanberger H, et al. International ERS/ESICM/ESCMID/ALAT guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: Guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia (HAP)/ventilator-associated pneumonia (VAP) of the European . Eur Respir J. 2017;50(3):1700582.
 18. Sociedad Española de Medicina Intensiva Crítica y Unidades Coronarias (SEMICYUC). Grupo de trabajo de enfermedades infecciosas y sepsis. Estudio nacional de vigilancia de la infección nosocomial en servicios de medicina intensiva. Informe 2019. [Internet]. [citado 7 de marzo de 2021]. Disponible en: <https://hws.vhebron.net/envin-helics/Help/Informe ENVIN-UCI 2019.pdf>

Referencias

19. Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, Muscedere J, Sweeney DA, Palmer LB, Napolitano LM, O'Grady NP, Bartlett JG, Carratalà J, El Solh AA, Ewig S, Fey PD, File TM Jr, Restrepo MI, Roberts JA, Waterer GW, Cruse P, Knight SL BJ. Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clin Infect Dis*. 2016;63(5):e61-111.
20. Lanks CW, Musani AI HD. Community-acquired Pneumonia and Hospital-acquired Pneumonia. *Med Clin North Am*. 2019;103(3):487-501.
21. Jain V, Bhardwaj A. Pneumonia Pathology [Internet]. StatPearls Publishing; 2020 [citado 19 de febrero de 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526116/>
22. Woods DE, Straus DC, Johanson WG Jr BJ. Role of Salivary Protease Activity in Adherence of Gram-Negative Bacilli to Mammalian Buccal Epithelial Cells in Vivo. *J Clin Invest*. 1981;68(6):1435-40.
23. Ramirez J. Overview of community-acquired pneumonia in adults - UpToDate [Internet]. 2020 [citado 2 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.uptodate.com/contents/overview-of-community-acquired-pneumonia-in-adults/print>
24. Long B, Long D, Koyfman A. Emergency Medicine Evaluation of Community-Acquired Pneumonia: History, Examination, Imaging and Laboratory Assessment, and Risk Scores. *J Emerg Med*. 2017;53(5).
25. Torres A, Peetermans W, Viegi G, Blasi F. Risk Factors for Community-Acquired Pneumonia in Adults in Europe: A Literature Review. *Thorax*.

- 2013;68(11):1057-65.
26. Oberg M, Jaakkola M, Woodward A, Peruga A, Prüss-Ustün A. Worldwide Burden of Disease From Exposure to Second-Hand Smoke: A Retrospective Analysis of Data From 192 Countries. *Lancet* (London, England). 2011;377(9760):139-46.
 27. Chisti M, Tebruegge M, La Vincente S, Graham S, Duke T. Pneumonia in Severely Malnourished Children in Developing Countries - Mortality Risk, Aetiology and Validity of WHO Clinical Signs: A Systematic Review. *Trop Med Int Health*. 2009;14(10):1173-89.
 28. Mukesh Dherani, Daniel Pope, Maya Mascarenhas, Kirk R Smith, Martin Weber, Nigel Bruce. Indoor Air Pollution From Unprocessed Solid Fuel Use and Pneumonia Risk in Children Aged Under Five Years: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Bull World Health Organ*. 2008;86(5):390-8.
 29. Nel A. Air Pollution-Related Illness: Effects of Particles. *Science* (80-). 6 de mayo de 2005;308(5723):804-6.
 30. Almirall J, Bolívar I, Balanzó X, González C. Risk Factors for Community-Acquired Pneumonia in Adults: A Population-Based Case-Control Study. *Eur Respir J*. 1999;13(2):349-55.
 31. Wu B, Segal L. The Lung Microbiome and Its Role in Pneumonia. *Clin Chest Med*. 2018;39(4):677-89.
 32. de Steenhuijsen Piters WA, Huijskens EG, Wyllie AL, Biesbroek G, van den Bergh MR, Veenhoven RH, Wang X, Trzciński K, Bonten MJ, Rossen JW, Sanders EA BD. Dysbiosis of Upper Respiratory Tract Microbiota in Elderly Pneumonia Patients. *ISME J*. 2016;10(1):97-108.

Referencias

33. Woo S, Park S-Y, Kim Y, Jeon JP, Lee JJ, Hong JY. The Dynamics of Respiratory Microbiota during Mechanical Ventilation in Patients with Pneumonia. *J Clin Med*. 2020;9(3):638.
34. Hanada S, Pirzadeh M, Carver KY, Deng JC. Respiratory Viral Infection-Induced Microbiome Alterations and Secondary Bacterial Pneumonia. *Front Immunol*. 2018;9:2640.
35. Morinaga Y, Take Y, Sasaki D, Ota K, Kaku N, Uno N, et al. Exploring the microbiota of upper respiratory tract during the development of pneumonia in a mouse model. *PLoS One*. 2019;14(9):e0222589.
36. Emonet S, Lazarevic V, Refondini CL, Gaia N, Leo S, Girard M, et al. Identification of respiratory microbiota markers in ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med*. 2019;45(8):1082-92.
37. Dickson RP, Schultz MJ, van der Poll T, Schouten LR, Falkowski NR, Luth JE, et al. Lung Microbiota Predict Clinical Outcomes in Critically Ill Patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020;201(5):555-63.
38. Bowater R, Stirling S, Lilford R. Is Antibiotic Prophylaxis in Surgery a Generally Effective Intervention? Testing a Generic Hypothesis Over a Set of Meta-Analyses. *Ann Surg*. 2009;249(4):551-6.
39. Schooley RT, Biswas B, Gill JJ, Hernandez-Morales A, Lancaster J, Lessor L, et al. Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails To Treat a Patient with a Disseminated Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(10):e00954-17.
40. Mitsi E, Roche A, Reiné J, Zangari T, Owugha J, Pennington S, et al.

- Agglutination by anti-capsular polysaccharide antibody is associated with protection against experimental human pneumococcal carriage. *Mucosal Immunol.* 2017;10(2):385-94.
41. Musher DM, Roig IL, Cazares G, Stager CE, Logan N, Safar H. Can an etiologic agent be identified in adults who are hospitalized for community-acquired pneumonia: Results of a one-year study. *J Infect.* julio de 2013;67(1).
 42. Garau J, Baquero F, Pérez-Trallero E, Pérez J-L, Martín-Sánchez AM, García-Rey C, et al. Factors impacting on length of stay and mortality of community-acquired pneumonia. *Clin Microbiol Infect.* 1 de abril de 2008;14(4):322-9.
 43. Bartlett JG. Diagnostic test for etiologic agents of community-acquired pneumonia. *Infect Dis Clin North Am.* 2004;18(4):809-27.
 44. Mundy LM, Auwaerter PG, Oldach D, Warner ML, Burton A, Vance E, et al. Community-acquired pneumonia: impact of immune status. *Am J Respir Crit Care Med.* 20 de octubre de 1995;152(4):1309-15.
 45. Burk M, El-Kersh K, Saad M, Wiemken T, Ramirez J, Cavallazzi R. Viral infection in community-acquired pneumonia: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir Rev.* 1 de junio de 2016;25(140):178-88.
 46. Griffin MR, Zhu Y, Moore MR, Whitney CG, Grijalva CG. US Pneumonia Hospitalizations, a Decade of Pneumococcal Conjugate Vaccine Use. *N Engl J Med.* 2013;369(2):155-63.
 47. Vila Estapé J, Zboromyrska Y, Vergara Gómez A, Alejo Cancho I, Rubio García E, Álvarez-Martínez MJ, et al. Métodos moleculares de diagnóstico

- de infecciones respiratorias. ¿Ha cambiado el esquema diagnóstico? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1 de julio de 2016;34:40-6.
48. Arnold F, Summersgill J, Ramirez J. Role of Atypical Pathogens in the Etiology of Community-Acquired Pneumonia. *Semin Respir Crit Care Med.* 2016;37(06):819-28.
 49. Alimi Y, Lim WS, Lansbury L, Leonardi-Bee J, Nguyen-Van-Tam JS. Systematic review of respiratory viral pathogens identified in adults with community-acquired pneumonia in Europe. *J Clin Virol.* 2017;95:26-35.
 50. Luyt C-E, Hékimian G, Koulenti D, Chastre J. Microbial cause of ICU-acquired pneumonia. *Curr Opin Crit Care.* 2018;24(5):332-8.
 51. Shebl E, Gulick PG. Nosocomial Pneumonia [Internet]. StatPearls Publishing; 2019 [citado 8 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535441/>
 52. Estudio nacional de vigilancia de la infección nosocomial en servicios de medicina intensiva. Informe 2019. Estudio nacional de vigilancia de la infección nosocomial en servicios de medicina intensiva. Informe 2018. [Internet]. [citado 27 de marzo de 2021]. Disponible en: <https://hws.vhebron.net/envin-helics/Help/Informe ENVIN-UCI 2018.pdf>
 53. Hellen Gelband, Molly Miller-Petrie, Suraj Pant, Sumanth Gandra, Jordan Levinson, Devra Barter, et al. The State of the World's Antibiotics, 2015 - Center for Disease Dynamics, Economics & Policy (CDDEP) [Internet]. [citado 24 de mayo de 2020]. Disponible en: https://cddep.org/publications/state_worlds_antibiotics_2015/
 54. World Health Organization. Antimicrobial resistance [Internet]. 2018

- [citado 24 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
55. Cillóniz C, Dominedò C, Torres A. Multidrug Resistant Gram-Negative Bacteria in Community-Acquired Pneumonia. *Crit Care*. 2019;23:79.
 56. CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States [Internet]. 2019 [citado 4 de abril de 2021]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>
 57. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) Annual Epidemiological Report for 2019 [Internet]. 2020 [citado 4 de abril de 2021]. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/surveillance-antimicrobial-resistance-Europe-2019.pdf>
 58. O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations | Wellcome Collection [Internet]. 2016 [citado 24 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://wellcomecollection.org/works/thvwsuba>
 59. Versporten A, Zarb P, Caniaux I, Gros M-F, Drapier N, Miller M, et al. Antimicrobial consumption and resistance in adult hospital inpatients in 53 countries: results of an internet-based global point prevalence survey. *Lancet Glob Heal*. 2018;6(6):e619-29.
 60. O'Neill J. Rapid diagnostics: stopping unnecessary use of antibiotics | Wellcome Collection [Internet]. 2015 [citado 24 de mayo de 2020].

Disponible en: <https://wellcomecollection.org/works/gcrdafjx>

61. Shorr AF, Zilberberg MD, Micek ST, Kollef MH. Prediction of Infection Due to Antibiotic-Resistant Bacteria by Select Risk Factors for Health Care–Associated Pneumonia. *Arch Intern Med.* 10 de noviembre de 2008;168(20):2205-10.
62. Prina E, Ranzani OT, Polverino E, Cillóniz C, Ferrer M, Fernandez L, et al. Risk Factors Associated with Potentially Antibiotic-Resistant Pathogens in Community-Acquired Pneumonia. *Ann Am Thorac Soc.* 2015;12(2):153-60.
63. Jeong B-H, Koh W-J, Yoo H, Park HY, Suh GY, Chung MP, et al. Risk Factors for Acquiring Potentially Drug-Resistant Pathogens in Immunocompetent Patients with Pneumonia Developed Out of Hospital. *Respiration.* 2014;88(3):190-8.
64. Torres A, Barberán J, Ceccato A, Martin-Loeches I, Ferrer M, Menéndez R, et al. Neumonía intrahospitalaria. Normativa de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR). Actualización 2020. *Arch Bronconeumol.* 2020;56:11-9.
65. Dominedò C, Ceccato A, Niederman M, Cillóniz C, Gabarrús A, Martin-Loeches I, et al. Predictive Performance of Risk Factors for MDR Pathogens in Nosocomial Pneumonia. *Ann Am Thorac Soc.* 2020;
66. Bush K, Bradford PA. Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 18 de marzo de 2020;33(2):e00047-19.
67. Sawa T, Kooguchi K, Moriyama K. Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial

- resistance. *J Intensive Care*. 2020;8(1):13.
68. Ambler R. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc London B, Biol Sci*. 16 de mayo de 1980;289(1036):321-31.
 69. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):969-76.
 70. Cantón R, Coque TM. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol*. 2006;9(5):466-75.
 71. Jacobs MR, Koornhof HJ, Robins-Browne RM, Stevenson CM, Vermaak ZA, Freiman I, et al. Emergence of Multiply Resistant Pneumococci. *N Engl J Med*. 1978;299(14):735-40.
 72. Ríos Dueñas E, Rodríguez-Avial I, Picazo JJ. In vitro activity of ceftobiprole and seven other antimicrobial agents against invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;30(12):1621-5.
 73. Welte T, Torres A, Nathwani D. Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe. *Thorax*. 2012;67(1).
 74. Peyrani P, Mandell L, Torres A, Tillotson GS. The burden of community-acquired bacterial pneumonia in the era of antibiotic resistance. *Expert Rev Respir Med*. 2019;13(2).
 75. Wunderink R, Yin Y. Antibiotic Resistance in Community-Acquired Pneumonia Pathogens. *Semin Respir Crit Care Med*. 2016;37(06):829-38.
 76. Morozumi M, Hasegawa K, Kobayashi R, Inoue N, Iwata S, Kuroki H, et al. Emergence of Macrolide-Resistant *Mycoplasma pneumoniae* with a 23S

- rRNA Gene Mutation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(6):2302-6.
77. Critchley IA, Jones ME, Heinze PD, Hubbard D, Engler HD, Evangelista AT, et al. In vitro activity of levofloxacin against contemporary clinical isolates of *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* from North America and Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2002;8(4):214-21.
78. Aliberti S, Reyes LF, Faverio P, Sotgiu G, Dore S, Rodriguez AH, et al. Global initiative for meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia (GLIMP): an international, observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(12):1364-76.
79. Aliberti S, Cilloniz C, Chalmers JD, Zanaboni AM, Cosentini R, Tarsia P, et al. Multidrug-resistant pathogens in hospitalised patients coming from the community with pneumonia: a European perspective. *Thorax.* 2013;68(11):997-9.
80. Ishida T, Ito A, Washio Y, Yamazaki A, Noyama M, Tokioka F, et al. Risk factors for drug-resistant pathogens in immunocompetent patients with pneumonia: Evaluation of PES pathogens. *J Infect Chemother.* 2017;23(1):23-8.
81. Restrepo MI, Babu BL, Reyes LF, Chalmers JD, Soni NJ, Sibila O, et al. Burden and risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* community-acquired pneumonia: a multinational point prevalence study of hospitalised patients. *Eur Respir J.* 2018;52(2):1701190.
82. Cillóniz C, Gabarrús A, Ferrer M, Bellacasa JP de la, Rinaudo M, Mensa J, et al. Community-Acquired Pneumonia Due to Multidrug- and Non-

- Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest*. 2016;150(2):415-25.
83. Torres A, Cillóniz C, Ferrer M, Gabarrús A, Polverino E, Villegas S, et al. Bacteraemia and antibiotic-resistant pathogens in community acquired pneumonia: risk and prognosis. *Eur Respir J*. 2015;45(5):1353-63.
84. Gross AE, Schooneveld TC Van, Olsen KM, Rupp ME, Bui TH, Forsung E, et al. Epidemiology and Predictors of Multidrug-Resistant Community-Acquired and Health Care-Associated Pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(9):5262-8.
85. Shindo Y, Hasegawa Y. Regional differences in antibiotic-resistant pathogens in patients with pneumonia: Implications for clinicians. *Respirology*. noviembre de 2017;22(8).
86. Chalmers J. The Modern Diagnostic Approach to Community-Acquired Pneumonia in Adults. *Semin Respir Crit Care Med*. 2016;37(06):876-85.
87. Kolditz M, Braeken D, Ewig S, Rohde G. Severity Assessment and the Immediate and Long-Term Prognosis in Community-Acquired Pneumonia. *Semin Respir Crit Care Med*. 2016;37(06):886-96.
88. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society Consensus Guidelines on the Management of Community-Acquired Pneumonia in Adults. *Clin Infect Dis*. 2007;44(2):S27-72.
89. Barlow G, Nathwani D, Williams F, Ogston S, Winter J, Jones M, et al. Reducing door-to-antibiotic time in community-acquired pneumonia: controlled before-and-after evaluation and cost-effectiveness analysis.

- Thorax. 2007;62(1):67-74.
90. Yu KT, Wyer PC. Evidence Behind the 4-Hour Rule for Initiation of Antibiotic Therapy in Community-Acquired Pneumonia. *Ann Emerg Med.* 2008;51(5):651-62.
 91. Zumla A, Al-Tawfiq JA, Enne VI, Kidd M, Drosten C, Breuer J, et al. Rapid point of care diagnostic tests for viral and bacterial respiratory tract infections—needs, advances, and future prospects. *Lancet Infect Dis.* 2014;14(11):1123-35.
 92. Waterer G, Wunderink R. The Influence of the Severity of Community-Acquired Pneumonia on the Usefulness of Blood Cultures. *Respir Med.* 2001;95(1):78-82.
 93. Campbell SG, Marrie TJ, Anstey R, Dickinson G, Ackroyd-Stolarz S. The Contribution of Blood Cultures to the Clinical Management of Adult Patients Admitted to the Hospital With Community-Acquired Pneumonia. *Chest.* 2003;123(4):1142-50.
 94. Benenson RS, Kepner AM, Pyle DN, Cavanaugh S. Selective Use of Blood Cultures in Emergency Department Pneumonia Patients. *J Emerg Med.* 2007;33(1):1-8.
 95. Nima A, Tabas J, Afshar K, Silbergleit R. Blood cultures for community-acquired pneumonia: Are they worthy of two quality measures? A systematic review There was no external funding source for this systematic review. *J Hosp Med.* 2009;112-23.
 96. Domínguez J, Galí N, Blanco S, Pedroso P, Prat C, Matas L, et al. Detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen by a rapid

- immunochematographic assay in urine samples. *Chest*. 2001;119(1):243-9.
97. Shoji H, Domenech A, Simonetti AF, González A, García-Somoza D, Cubero M, et al. The Alere BinaxNOW Pneumococcal Urinary Antigen Test: Diagnostic Sensitivity for Adult Pneumococcal Pneumonia and Relationship to Specific Serotypes. *J Clin Microbiol*. 2018;56(2):e00787-17.
98. Viasus D, Calatayud L, McBrown M V., Ardanuy C, Carratalà J. Urinary antigen testing in community-acquired pneumonia in adults: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2019;17(2):107-15.
99. Domínguez JA, Manterola JM, Blavia R, Sopena N, Belda FJ, Padilla E, et al. Detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in nonconcentrated urine and urine concentrated by selective ultrafiltration. *J Clin Microbiol*. 1996;34(9):2334-6.
100. Botelho-Nevers E, Grattard F, Viallon A, Allegra S, Jarraud S, Verhoeven P, et al. Prospective evaluation of RT-PCR on sputum versus culture, urinary antigens and serology for Legionnaire's disease diagnosis. *J Infect*. 2016;73(2):123-8.
101. Phin N, Parry-Ford F, Harrison T, Stagg HR, Zhang N, Kumar K, et al. Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. *Lancet Infect Dis*. 2014;14(10):1011-21.
102. Murdoch DR, Podmore RG, Anderson TP, Barratt K, Maze MJ, French KE, et al. Impact of Routine Systematic Polymerase Chain Reaction Testing on Case Finding for Legionnaires' Disease: A Pre-Post Comparison Study. *Clin*

Referencias

- Infect Dis. 2013;57(9):1275-81.
103. Thurman KA, Walter ND, Schwartz SB, Mitchell SL, Dillon MT, Baughman AL, et al. Comparison of Laboratory Diagnostic Procedures for Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in Community Outbreaks. *Clin Infect Dis*. 2009;48(9):1244-9.
 104. Goldstein EJC, Kumar S, Hammerschlag MR. Acute Respiratory Infection Due to *Chlamydia pneumoniae*: Current Status of Diagnostic Methods. *Clin Infect Dis*. 2007;44(4):568-76.
 105. Torres A, Lee N, Cilloniz C, Vila J, Van der Eerden M. Laboratory diagnosis of pneumonia in the molecular age. *Eur Respir J*. 2016;48(6):1764-78.
 106. Wang W, Ren P, Sheng J, Mardy S, Yan H, Zhang J, et al. Simultaneous detection of respiratory viruses in children with acute respiratory infection using two different multiplex reverse transcription-PCR assays. *J Virol Methods*. 2009;162(1-2):40-5.
 107. Pierce VM, Hodinka RL. Comparison of the GenMark Diagnostics eSensor respiratory viral panel to real-time PCR for detection of respiratory viruses in children. *J Clin Microbiol*. 2012;50(11):3458-65.
 108. VERIGENE® Respiratory Pathogen Flex Test | Respiratory Infections [Internet]. [citado 28 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.luminexcorp.com/respiratory-pathogens-flex-test/>
 109. Lee CK, Lee HK, Ng CWS, Chiu L, Tang JWT, Loh TP, et al. Comparison of Luminex NxTAG Respiratory Pathogen Panel and xTAG Respiratory Viral Panel FAST Version 2 for the Detection of Respiratory Viruses. *Ann Lab Med*. 2017;37(3):267-71.

110. Frobert E, Escuret V, Javouhey E, Casalegno JS, Bouscambert-Duchamp M, Moulinier C, et al. Respiratory viruses in children admitted to hospital intensive care units: evaluating the CLART® Pneumovir DNA array. *J Med Virol*. 2011;83(1):150-5.
111. Kim H-K, Oh S-H, Yun KA, Sung H, Kim M-N. Comparison of Anyplex II RV16 with the xTAG respiratory viral panel and Seeplex RV15 for detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol*. 2013;51(4):1137-41.
112. Leber AL, Everhart K, Daly JA, Hopper A, Harrington A, Schreckenberger P, et al. Multicenter Evaluation of BioFire FilmArray Respiratory Panel 2 for Detection of Viruses and Bacteria in Nasopharyngeal Swab Samples. *J Clin Microbiol*. 2018;56(6):e01945-17.
113. Lee SH, Ruan S-Y, Pan S-C, Lee T-F, Chien J-Y, Hsueh P-R. Performance of a multiplex PCR pneumonia panel for the identification of respiratory pathogens and the main determinants of resistance from the lower respiratory tract specimens of adult patients in intensive care units. *J Microbiol Immunol Infect*. 2019;52(6):920-8.
114. Biofire diagnostics - FilmArray Pneumonia panel. [Internet]. [citado 25 de febrero de 2019]. Disponible en: www.biofire.com/products/the-filmarray-panels/filmarray-pneumonia/
115. Crémet L, Gaborit B, Bouras M, Drumel T, Guillotin F, Poulain C, et al. Evaluation of the FilmArray® Pneumonia Plus Panel for Rapid Diagnosis of Hospital-Acquired Pneumonia in Intensive Care Unit Patients. *Front Microbiol*. 2020;11.
116. Chen J, Lam H, Yip C, Cheng V, Chan J, Leung T, et al. Evaluation of the

Referencias

- molecular Xpert Xpress Flu/RSV assay vs. Alere i Influenza A & B assay for rapid detection of influenza viruses. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2018;90(3):177-80.
117. Jamal W, Al Roomi E, AbdulAziz LR, Rotimi VO. Evaluation of Curetis Unyvero, a multiplex PCR-based testing system, for rapid detection of bacteria and antibiotic resistance and impact of the assay on management of severe nosocomial pneumonia. *J Clin Microbiol.* 2014;52(7):2487-92.
118. Unyvero HPN hospitalized pneumonia application manual. [Internet]. [citado 27 de febrero de 2019]. Disponible en: https://curetis.com/wp-content/uploads/00255_HP_N_ApplicationManual_Rev6-EN.pdf
119. Tellapragada C, Giske CG. The Unyvero Hospital-Acquired pneumonia panel for diagnosis of secondary bacterial pneumonia in COVID-19 patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021;
120. Gadsby NJ, McHugh MP, Forbes C, MacKenzie L, Hamilton SKD, Griffith DM, et al. Comparison of Unyvero P55 Pneumonia Cartridge, in-house PCR and culture for the identification of respiratory pathogens and antibiotic resistance in bronchoalveolar lavage fluids in the critical care setting. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019;38(6).
121. Peiffer-Smadja N, Bouadma L, Mathy V, Allouche K, Patrier J, Reboul M, et al. Performance and impact of a multiplex PCR in ICU patients with ventilator-associated pneumonia or ventilated hospital-acquired pneumonia. *Crit Care.* 2020;24(1).
122. Collins ME, Popowitch EB, Miller MB. Evaluation of a Novel Multiplex PCR

- Panel Compared to Quantitative Bacterial Culture for Diagnosis of Lower Respiratory Tract Infections. *J Clin Microbiol.* 2020;58(5).
123. PathoFinder [Internet]. [citado 28 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.pathofinder.com/2smart-products/pf2600-2s>
124. Parčina M, Schneider UV, Visseaux B, Jozić R, Hannet I, Lisby JG. Multicenter evaluation of the QIAstat Respiratory Panel—A new rapid highly multiplexed PCR based assay for diagnosis of acute respiratory tract infections. Chan KH, editor. *PLoS One.* 2020;15(3):e0230183.
125. Vandendriessche S, Padalko E, Wollants E, Verfaillie C, Verhasselt B, Coorevits L. Evaluation of the Seegene Allplex™ Respiratory Panel for diagnosis of acute respiratory tract infections. *Acta Clin Belg.* 2019;74(6):379-85.
126. Gibson J, Schechter-Perkins EM, Mitchell P, Mace S, Tian Y, Williams K, et al. Multi-center evaluation of the cobas® Liat® Influenza A/B & RSV assay for rapid point of care diagnosis. *J Clin Virol.* 2017;95:5-9.
127. Babady NE, England MR, Jurcic Smith KL, He T, Wijetunge DS, Tang Y-W, et al. Multicenter Evaluation of the ePlex Respiratory Pathogen Panel for the Detection of Viral and Bacterial Respiratory Tract Pathogens in Nasopharyngeal Swabs. *J Clin Microbiol.* 2018;56(2):e01658-17.
128. Tuite N, Reddington K, Barry T, Zumla A, Enne V. Rapid nucleic acid diagnostics for the detection of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria: is it time for a paradigm shift? *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(7):1729-33.
129. Rogers BB, Shankar P, Jerris RC, Kotzbauer D, Anderson EJ, Watson JR,

Referencias

- et al. Impact of a Rapid Respiratory Panel Test on Patient Outcomes. *Arch Pathol Lab Med.* 2015;139(5):636-41.
130. Subramony A, Zachariah P, Kronos A, Whittier S, Saiman L. Impact of Multiplex Polymerase Chain Reaction Testing for Respiratory Pathogens on Healthcare Resource Utilization for Pediatric Inpatients. *J Pediatr.* 2016;173.
131. Rappo U, Schuetz AN, Jenkins SG, Calfee DP, Walsh TJ, Wells MT, et al. Impact of Early Detection of Respiratory Viruses by Multiplex PCR Assay on Clinical Outcomes in Adult Patients. *J Clin Microbiol.* 2016;54(8).
132. Buchan BW, Windham S, Balada-Llasat J-M, Leber A, Harrington A, Relich R, et al. Practical Comparison of the BioFire FilmArray Pneumonia Panel to Routine Diagnostic Methods and Potential Impact on Antimicrobial Stewardship in Adult Hospitalized Patients with Lower Respiratory Tract Infections. *J Clin Microbiol.* 2020;58(7).
133. Leone M, Malavieille F, Papazian L, Meyssignac B, Cassir N, Textoris J, et al. Routine use of *Staphylococcus aureus* rapid diagnostic test in patients with suspected ventilator-associated pneumonia. *Crit Care.* 2013;17(4):R170.
134. Dugas AF, Coleman S, Gaydos CA, Rothman RE, Frick KD. Cost-utility of rapid polymerase chain reaction-based influenza testing for high-risk emergency department patients. *Ann Emerg Med.* 2013;62(1):80-8.
135. Brendish NJ, Malachira AK, Armstrong L, Houghton R, Aitken S, Nyimbili E, et al. Routine molecular point-of-care testing for respiratory viruses in adults presenting to hospital with acute respiratory illness (ResPOC): a

- pragmatic, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Respir Med.* 2017;5(5).
136. Strålin K, Ehn F, Giske CG, Ullberg M, Hedlund J, Petersson J, et al. The IRIDICA PCR/Electrospray Ionization-Mass Spectrometry Assay on Bronchoalveolar Lavage for Bacterial Etiology in Mechanically Ventilated Patients with Suspected Pneumonia. Chaturvedi V, editor. *PLoS One.* 2016;11(7):e0159694.
 137. Vincent J-L, Brealey D, Libert N, Abidi NE, O'Dwyer M, Zacharowski K, et al. Rapid Diagnosis of Infection in the Critically Ill, a Multicenter Study of Molecular Detection in Bloodstream Infections, Pneumonia, and Sterile Site Infections. *Crit Care Med.* 2015;43(11):2283-91.
 138. Ullberg M, Lüthje P, Mölling P, Strålin K, Özenci V. Broad-Range Detection of Microorganisms Directly from Bronchoalveolar Lavage Specimens by PCR/Electrospray Ionization-Mass Spectrometry. Chaturvedi V, editor. *PLoS One.* 2017;12(1):e0170033.
 139. Özenci V, Patel R, Ullberg M, Strålin K. Demise of Polymerase Chain Reaction/Electrospray Ionization-Mass Spectrometry as an Infectious Diseases Diagnostic Tool. *Clin Infect Dis.* 2018;66(3):452-5.
 140. Caliendo AM, Gilbert DN, Ginocchio CC, Hanson KE, May L, Quinn TC, et al. Better Tests, Better Care: Improved Diagnostics for Infectious Diseases. *Clin Infect Dis An Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2013;57(Suppl 3):139-70.
 141. Zhao Y, Chen F, Li Q, Wang L, Fan C. Isothermal Amplification of Nucleic Acids. *Chem Rev.* 2015;115(22):12491-545.

Referencias

142. Troger V, Niemann K, Gärtig C, Kuhlmeier D. Isothermal Amplification and Quantification of Nucleic Acids and its Use in Microsystems. *J Nanomed Nanotechnol.* 2015;06(03):1-19.
143. Yan L, Zhou J, Zheng Y, Gamson AS, Roembke BT, Nakayama S, et al. Isothermal amplified detection of DNA and RNA. *Mol Biosyst.* 2014;10(5):970-1003.
144. Md Fakruddin, Khanjada Shahnewaj Bin Mannan, Abhijit Chowdhury, Reaz Mohammad Mazumdar, Md Nur Hossain, Sumaiya Islam, et al. Nucleic Acid Amplification: Alternative Methods of Polymerase Chain Reaction. *J Pharm Bioallied Sci.* 2013;5(4):245-52.
145. Gill P, Ghaemi A. Nucleic Acid Isothermal Amplification Technologies: A Review. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2008;27(3):224-43.
146. J C. Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. *Nature.* 1991;350(6313):91-2.
147. Walker GT, Fraiser MS, Schram JL, Little MC, Nadeau JG, Malinowski DP. Strand displacement amplification--an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucleic Acids Res.* 1992;20(7):1691-6.
148. Wharam SD, Marsh P, Lloyd J, S., Ray T, D., et al. Specific detection of DNA and RNA targets using a novel isothermal nucleic acid amplification assay based on the formation of a three-way junction structure. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(11):e54.
149. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(12):e63.

150. Wang Y, Wang Y, Ma A-J, Li D-X, Luo L-J, Liu D-X, et al. Rapid and Sensitive Isothermal Detection of Nucleic-acid Sequence by Multiple Cross Displacement Amplification. *Sci Rep.* 2015;5:11902.
151. Obande GA, Singh KKB. Current and Future Perspectives on Isothermal Nucleic Acid Amplification Technologies for Diagnosing Infections. *Infect Drug Resist.* 2020;13:455-83.
152. Craw P, Balachandran W. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review. *Lab Chip.* 2012;12(14):2469-86.
153. Charalampous T, Kay GL, Richardson H, Aydin A, Baldan R, Jeanes C, et al. Nanopore metagenomics enables rapid clinical diagnosis of bacterial lower respiratory infection. *Nat Biotechnol.* 2019;37(7).
154. Votintseva AA, Bradley P, Pankhurst L, del Ojo Elias C, Loose M, Nilgiriwala K, et al. Same-Day Diagnostic and Surveillance Data for Tuberculosis via Whole-Genome Sequencing of Direct Respiratory Samples. Tang Y-W, editor. *J Clin Microbiol.* mayo de 2017;55(5):1285-98.
155. Charalampous T, Richardson H, Kay GL, Baldan R, Jeanes C, Rae D, et al. Rapid Diagnosis of Lower Respiratory Infection using Nanopore-based Clinical Metagenomics. *bioRxiv.* 2018;387548.
156. Yang L, Haidar G, Zia H, Nettles R, Qin S, Wang X, et al. Metagenomic identification of severe pneumonia pathogens in mechanically-ventilated patients: a feasibility and clinical validity study. *Respir Res.* 2019;20(1):265.
157. Kitsios GD, Fitch A, Manatakis D V., Rapport SF, Li K, Qin S, et al.

Referencias

- Respiratory Microbiome Profiling for Etiologic Diagnosis of Pneumonia in Mechanically Ventilated Patients. *Front Microbiol.* 2018;9.
158. Forbes JD, Knox NC, Peterson C-L, Reimer AR. Highlighting Clinical Metagenomics for Enhanced Diagnostic Decision-making: A Step Towards Wider Implementation. *Comput Struct Biotechnol J.* 2018;16:108-20.
159. Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J Biochem Biophys Methods.* 2007;70(3):499-501.
160. Zhang X, Lowe SB, Gooding JJ. Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biosens Bioelectron.* 2014;61:491-9.
161. Kubota R, Vine BG, Alvarez AM, Jenkins DM. Detection of *Ralstonia solanacearum* by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Phytopathology.* 2008;98(9):1045-51.
162. Hong M, Zha L, Fu W, Zou M, Li W, Xu D. A modified visual loop-mediated isothermal amplification method for diagnosis and differentiation of main pathogens from *Mycobacterium tuberculosis* complex. *World J Microbiol Biotechnol.* 2012;28(2):523-31.
163. Safavieh M, Ahmed MU, Sokullu E, Ng A, Braescu L, Zourob M. A simple cassette as point-of-care diagnostic device for naked-eye colorimetric bacteria detection. *Analyst.* 2014;139(2):482-7.
164. Le TH, Nguyen NTB, Truong NH, De N Van. Development of mitochondrial loop-mediated isothermal amplification for detection of the small liver fluke *Opisthorchis viverrini* (Opisthorchiidae; Trematoda;

- Platyhelminthes). *J Clin Microbiol*. 2012;50(4):1178-84.
165. Shan X, Zhang Y, Zhang Z, Chen M, Su Y, Yuan Y, et al. Rapid detection of food-borne *Listeria monocytogenes* by real-time quantitative loop-mediated isothermal amplification. *Food Sci Biotechnol*. 2012;21(1):101-6.
166. Yi M, Ling L, Neogi SB, Fan Y, Tang D, Yamasaki S, et al. Real time loop-mediated isothermal amplification using a portable fluorescence scanner for rapid and simple detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Control*. 2014;41:91-5.
167. Ahmad F, Seyrig G, Tourlousse DM, Stedtfeld RD, Tiedje JM, Hashsham SA. A CCD-based fluorescence imaging system for real-time loop-mediated isothermal amplification-based rapid and sensitive detection of waterborne pathogens on microchips. *Biomed Microdevices*. 2011;13(5):929-37.
168. Safavieh M, Ahmed MU, Tolba M, Zourob M. Microfluidic electrochemical assay for rapid detection and quantification of *Escherichia coli*. *Biosens Bioelectron*. 2012;31(1):523-8.
169. Wang X, Teng D, Guan Q, Tian F, Wang J. Detection of Roundup Ready soybean by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral-flow dipstick. *Food Control*. 2013;29(1):213-20.
170. Lee M-F, Chen Y-H, Peng C-F. Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification in conjunction with ELISA-hybridization assay for molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microbiol Methods*. 2009;76(2):174-80.

Referencias

171. Mayboroda O, Katakis I, O'Sullivan CK. Multiplexed isothermal nucleic acid amplification. *Anal Biochem.* 2018;545:20-30.
172. Mahony J, Chong S, Bulir D, Ruyter A, Mwawasi K, Waltho D. Multiplex loop-mediated isothermal amplification (M-LAMP) assay for the detection of influenza A/H1, A/H3 and influenza B can provide a specimen-to-result diagnosis in 40 min with single genome copy sensitivity. *J Clin Virol.* 2013;58(1):127-31.
173. Liu N, Zou D, Dong D, Yang Z, Ao D, Liu W, et al. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification method for the simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Vibrio parahaemolyticus*. *Sci Rep.* 2017;7:45601.
174. Nyan D-C, Swinson KL. A novel multiplex isothermal amplification method for rapid detection and identification of viruses. *Sci Rep.* 2015;5(1):17925.
175. Wang Y, Wang Y, Lan R, Xu H, Ma A, Li D, et al. Multiple Endonuclease Restriction Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification: A Novel Analytically Rapid, Sensitive, Multiplex Loop-Mediated Isothermal Amplification Detection Technique. *J Mol Diagn.* 2015;17(4):392-401.
176. Tanner NA, Zhang Y, Evans TC. Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification. *Biotechniques.* 2012;53(2):81-9.
177. Aonuma H, Yoshimura A, Kobayashi T, Okado K, Badolo A, Nelson B, et al. A single fluorescence-based LAMP reaction for identifying multiple parasites in mosquitoes. *Exp Parasitol.* 2010;125(2):179-83.
178. Nkouawa A, Sako Y, Okamoto M, Ito A. Simple Identification of Human

- Taenia Species by Multiplex Loop-Mediated Isothermal Amplification in Combination with Dot Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;94(6):1318-23.
179. Burillo A, Marín M, Cercenado E, Ruiz-Carrascoso G, Pérez-Granda MJ, Oteo J, et al. Evaluation of the Xpert Carba-R (Cepheid) Assay Using Contrived Bronchial Specimens from Patients with Suspicion of Ventilator-Associated Pneumonia for the Detection of Prevalent Carbapenemases. Floto AR, editor. *PLoS One.* 2016;11(12):e0168473.
180. X. Ding YM. Lab-on-a-Chip Fabrication and Application - Google Libros. En: M. Stoytcheva RZ, editor. *Lab-on-a-chip fabrication and application.* InTech Inc, London; 2016. p. 125-55.
181. Yuan H, Chao Y, Li S, Tang MYH, Huang Y, Che Y, et al. Picoinjection-Enabled Multitarget Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detection of Foodborne Pathogens. *Anal Chem.* 2018;90(22):13173-7.
182. Hu Y, Xu P, Luo J, He H, Du W. Absolute Quantification of H5-Subtype Avian Influenza Viruses Using Droplet Digital Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Anal Chem.* 2017;89(1):745-50.
183. Reuter C, Slesiona N, Hentschel S, Aehlig O, Breitenstein A, Csáki A, et al. Loop-mediated amplification as promising on-site detection approach for *Legionella pneumophila* and *Legionella* spp. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020;104(1):405-15.
184. Kreutz JE, Wang J, Sheen AM, Thompson AM, Staheli JP, Dyen MR, et al. Self-digitization chip for quantitative detection of human papillomavirus gene using digital LAMP. *Lab Chip.* 2019;19(6):1035-40.

Referencias

185. Nixon G, Garson JA, Grant P, Nastouli E, Foy CA, Huggett JF. Comparative Study of Sensitivity, Linearity, and Resistance to Inhibition of Digital and Nondigital Polymerase Chain Reaction and Loop Mediated Isothermal Amplification Assays for Quantification of Human Cytomegalovirus. *Anal Chem*. 2014;86(9):4387-94.
186. Schoepp NG, Schlappi TS, Curtis MS, Butkovich SS, Miller S, Humphries RM, et al. Rapid pathogen-specific phenotypic antibiotic susceptibility testing using digital LAMP quantification in clinical samples. *Sci Transl Med*. 2017;9(410):eaal3693.
187. Craw P, Balachandran W. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review. *Lab Chip*. 2012;12(14):2469-86.
188. Almassian DR, Cockrell LM, Nelson WM. Portable nucleic acid thermocyclers. *Chem Soc Rev*. 2013;42(22):8769.
189. Chen C, Liu P, Zhao X, Du W, Feng X, Liu B-F. A self-contained microfluidic in-gel loop-mediated isothermal amplification for multiplexed pathogen detection. *Sensors Actuators B Chem*. 2017;239.
190. Patel JC, Lucchi NW, Srivastava P, Lin JT, Sug-Aram R, Aruncharus S, et al. Field evaluation of a real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification assay, RealAmp, for the diagnosis of malaria in Thailand and India. *J Infect Dis*. 2014;210(8):1180-7.
191. Benzine JW, Brown KM, Agans KN, Godiska R, Mire CE, Gowda K, et al. Molecular Diagnostic Field Test for Point-of-Care Detection of Ebola Virus Directly From Blood. *J Infect Dis*. 2016;214(suppl 3):S234-42.

192. Yang T, Wang Y-C, Shen C-F, Cheng C-M. Point-of-Care RNA-Based Diagnostic Device for COVID-19. *Diagnostics*. 2020;10(3):165.
193. Nguyen T, Duong Bang D, Wolff A. 2019 Novel Coronavirus Disease (COVID-19): Paving the Road for Rapid Detection and Point-of-Care Diagnostics. *Micromachines*. 2020;11(3):306.
194. Ağel HE, Sağcan H, Ceyhan I, Durmaz R. Optimization of isothermal amplification method for *Mycobacterium tuberculosis* detection and visualization method for fieldwork. *Turkish J Med Sci*. 2020;50(4):1069-75.
195. Jaroenram W, Kampeera J, Arunrut N, Karuwan C, Sappat A, Khumwan P, et al. Graphene-based electrochemical genosensor incorporated loop-mediated isothermal amplification for rapid on-site detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Pharm Biomed Anal*. 2020;186:113333.
196. Nzelu CO, Kato H, Peters NC. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): An advanced molecular point-of-care technique for the detection of *Leishmania* infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(11):e0007698.
197. García-Bernalt Diego J, Fernández-Soto P, Crego-Vicente B, Alonso-Castrillejo S, Febrer-Sendra B, Gómez-Sánchez A, et al. Progress in loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Schistosoma mansoni* DNA: towards a ready-to-use test. *Sci Rep*. 2019;9(1):14744.
198. Batule BS, Seok Y, Kim M-G. Paper-based nucleic acid testing system for simple and early diagnosis of mosquito-borne RNA viruses from human serum. *Biosens Bioelectron*. 2020;151:111998.
199. Trinh TND, La HC, Lee NY. Fully Integrated and Foldable Microdevice

Referencias

- Encapsulated with Agarose for Long-Term Storage Potential for Point-of-Care Testing of Multiplex Foodborne Pathogens. *ACS Sensors*. 2019;4(10):2754-62.
200. Xing J, Yu J, Liu Y. Improvement and evaluation of loop-mediated isothermal amplification combined with chromatographic flow dipstick assays for *Vibrio parahaemolyticus*. *J Microbiol Methods*. 2020;171:105866.
201. Le Thi N, Ikuyo T, Nguyen Gia B, Truong Thai P, Vu Thi T Van, Bui Minh V, et al. A clinic-based direct real-time fluorescent reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for influenza virus. *J Virol Methods*. 2020;277:113801.
202. Phillips EA, Moehling TJ, Ejendal KFK, Hoilett OS, Byers KM, Basing LA, et al. Microfluidic rapid and autonomous analytical device (microRAAD) to detect HIV from whole blood samples. *Lab Chip*. 2019;19(20):3375-86.
203. Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Expansion of its practical application as a tool to achieve universal health coverage. *J Infect Chemother*. 2020;26(1).
204. Li Y, Fan P, Zhou S, Zhang L. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens. *Microb Pathog*. 2017;107:54-61.
205. Dhama K, Karthik K, Chakrabort S, Tiwari R, Kapoor S, Kumar A, et al. Loop-mediated Isothermal Amplification of DNA (LAMP): A New Diagnostic Tool Lights the World of Diagnosis of Animal and Human Pathogens: A Review. *Pakistan J Biol Sci*. 2014;17(2):151-66.

206. Kang Y, Deng R, Wang C, Deng T, Peng P, Cheng X, et al. Etiologic diagnosis of lower respiratory tract bacterial infections using sputum samples and quantitative loop-mediated isothermal amplification. *PLoS One*. 2012;7(6):e38743.
207. Wang F, Li R, Shang Y, Wang C, Wang G-Q, Zhou D-X, et al. A Pilot Study of Quantitative Loop-mediated Isothermal Amplification-guided Target Therapies for Hospital-acquired Pneumonia. *Chin Med J (Engl)*. 2016;129(2):181-6.
208. Hou J, Wu H, Zeng X, Rao H, Zhao P. Clinical evaluation of the loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of common lower respiratory pathogens in patients with respiratory symptoms. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(51):e13660.
209. Lu X, Mo Z-Y, Zhao H-B, Yan H, Shi L. LAMP-based method for a rapid identification of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;92(1):179-87.
210. Kawai Y, Miyashita N, Kishi F, Tabuchi M, Oda K, Yamaguchi T, et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of *Chlamydomonas pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009;28(7):801-5.
211. Cai Z-H, Dai Y-Y, Huang L-Y, Zhang W-S, Guo X-G. Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* by loop-mediated isothermal amplification: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):173.
212. Petrone BL, Wolff BJ, DeLaney AA, Diaz MH, Winchell JM. Isothermal Detection of *Mycoplasma pneumoniae* Directly from Respiratory Clinical

- Specimens. *J Clin Microbiol.* 2015;53(9):2970.
213. Shirato K, Semba S, El-Kafrawy SA, Hassan AM, Tolah AM, Takayama I, et al. Development of fluorescent reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) using quenching probes for the detection of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J Virol Methods.* 2018;258:41-8.
214. Ahn SJ, Baek YH, Lloren KKS, Choi W-S, Jeong JH, Antigua KJC, et al. Rapid and simple colorimetric detection of multiple influenza viruses infecting humans using a reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic platform. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1):676.
215. Sharma V, Chaudhry D, Kaushik S. Evaluation of clinical applicability of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for detection and subtyping of Influenza A viruses. *J Virol Methods.* 2018;253:18-25.
216. Mu Y, Zeng J, Chen Q, Liu J, Wang L, Yao F, et al. New method for the visual detection of human respiratory syncytial virus using reverse transcription loop-mediated amplification. *J Virol Methods.* 2014;206:84-8.
217. Hu Y, Wan Z, Mu Y, Zhou Y, Liu J, Lan K, et al. A quite sensitive fluorescent loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of respiratory syncytial virus. *J Infect Dev Ctries.* 2019;13(12):1135-41.
218. Zhou H, Zhao M, Li X, Zhang D, Zhou S, Chen C, et al. Clinical evaluation of the isothermal amplification assays for the detection of four common

- respiratory viruses in children with pneumonia. *Arch Virol.* 2017;162(5):1311-8.
219. Cheng C, Zheng F, Rui Y. Rapid Detection of bla NDM , bla KPC , bla IMP , and bla VIM Carbapenemase Genes in Bacteria by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Microb Drug Resist.* 2014;20(6):533-8.
220. Rello J, Perez A. Precision medicine for the treatment of severe pneumonia in intensive care. *Expert Rev Respir Med.* 2016;10(3):297-316.
221. Viasus D, Del Rio-Pertuz G, Simonetti AF, Garcia-Vidal C, Acosta-Reyes J, Garavito A, et al. Biomarkers for predicting short-term mortality in community-acquired pneumonia: A systematic review and meta-analysis. *J Infect.* 2016;72(3):273-82.
222. Califf RM. Biomarker definitions and their applications. *Exp Biol Med (Maywood).* 2018;243(3):213-21.
223. Sungurlu S, Balk RA. The Role of Biomarkers in the Diagnosis and Management of Pneumonia. *Clin Chest Med.* 2018;39(4):691-701.
224. Sánchez R, Gutiérrez C, Ángeles César M, Pastor R, Vilanova À. Procalcitonina y proteína C reactiva en el diagnóstico de neumonías bacterianas en pacientes de urgencias. *Rev del Lab Clínico.* 2008;1(2):59-63.
225. Chalmers JD, Singanayagam A, Hill AT. C-Reactive Protein Is an Independent Predictor of Severity in Community-acquired Pneumonia. *Am J Med.* 2008;121(3).
226. Menéndez R, Martínez R, Reyes S, Mensa J, Polverino E, Filella X, et al. Stability in community-acquired pneumonia: one step forward with

- markers? *Thorax*. 2009;64(11):987-92.
227. Menendez R, Martinez R, Reyes S, Mensa J, Filella X, Marcos MA, et al. Biomarkers improve mortality prediction by prognostic scales in community-acquired pneumonia. *Thorax*. 2009;64(7).
228. Niederman MS. Pneumonia: Considerations for the Critically Ill Patient. En: *Critical Care Medicine*. Elsevier; 2008. p. 867-83.
229. Self WH, Balk RA, Grijalva CG, Williams DJ, Zhu Y, Anderson EJ, et al. Procalcitonin as a Marker of Etiology in Adults Hospitalized With Community-Acquired Pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2017;65(2).
230. Christ-Crain M, Stolz D, Bingisser R, Müller C, Miedinger D, Huber PR, et al. Procalcitonin Guidance of Antibiotic Therapy in Community-acquired Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(1).
231. de Jong E, van Oers JA, Beishuizen A, Vos P, Vermeijden WJ, Haas LE, et al. Efficacy and safety of procalcitonin guidance in reducing the duration of antibiotic treatment in critically ill patients: a randomised, controlled, open-label trial. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(7).
232. Wirz Y, Meier MA, Bouadma L, Luyt CE, Wolff M, Chastre J, et al. Effect of procalcitonin-guided antibiotic treatment on clinical outcomes in intensive care unit patients with infection and sepsis patients: a patient-level meta-analysis of randomized trials. *Crit Care*. 2018;22(1).
233. Schuetz P, Wirz Y, Sager R, Christ-Crain M, Stolz D, Tamm M, et al. Procalcitonin to initiate or discontinue antibiotics in acute respiratory tract infections. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;
234. Menendez R, Cavalcanti M, Reyes S, Mensa J, Martinez R, Marcos MA,

- et al. Markers of treatment failure in hospitalised community acquired pneumonia. *Thorax*. 2008;63(5).
235. Ramírez P, Ferrer M, Martí V, Reyes S, Martínez R, Menéndez R, et al. Inflammatory biomarkers and prediction for intensive care unit admission in severe community-acquired pneumonia*. *Crit Care Med*. 2011;39(10).
236. Krüger S, Ewig S, Giersdorf S, Hartmann O, Suttorp N, Welte T. Cardiovascular and Inflammatory Biomarkers to Predict Short- and Long-Term Survival in Community-acquired Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(11):1426-34.
237. Self WH, Rosen J, Sharp SC, Filbin MR, Hou PC, Parekh AD, et al. Diagnostic Accuracy of FebriDx: A Rapid Test to Detect Immune Responses to Viral and Bacterial Upper Respiratory Infections. *J Clin Med*. 2017;6(10):94.
238. Shirley M. FebriDx®: A Rapid Diagnostic Test for Differentiating Bacterial and Viral Aetiologies in Acute Respiratory Infections. *Mol Diagn Ther*. 2019;23(6):803-9.
239. Engelmann I, Dubos F, Lobert P-E, Houssin C, Degas V, Sardet A, et al. Diagnosis of Viral Infections Using Myxovirus Resistance Protein A (MxA). *Pediatrics*. 2015;135(4):e985-93.
240. Méndez R, Menéndez R, Cillóniz C, Amara-Elori I, Amaro R, González P, et al. Initial Inflammatory Profile in Community-acquired Pneumonia Depends on Time since Onset of Symptoms. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;198(3).
241. Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK.

Referencias

- The Neutrophil Lipocalin NGAL Is a Bacteriostatic Agent that Interferes with Siderophore-Mediated Iron Acquisition. *Mol Cell*. 2002;10(5):1033-43.
242. Bolignano D, Donato V, Coppolino G, Campo S, Buemi A, Lacquaniti A, et al. Neutrophil Gelatinase–Associated Lipocalin (NGAL) as a Marker of Kidney Damage. *Am J Kidney Dis*. 2008;52(3):595-605.
243. Abella V, Scotece M, Conde J, Gómez R, Lois A, Pino J, et al. The potential of lipocalin-2/NGAL as biomarker for inflammatory and metabolic diseases. *Biomarkers*. 2015;20(8):565-71.
244. Chakraborty S, Kaur S, Guha S, Batra SK. The Multifaceted Roles of Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL) In Inflammation and Cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1826(1):129-69.
245. Min JH, Lee H, Chung SJ, Yeo Y, Park TS, Park DW, Moon JY, Kim SH, Kim TH, Sohn JW YH. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin for Predicting Intensive Care Unit Admission and Mortality in Patients with Pneumonia. *Tohoku J Exp Med*. 2020;250(4):243-51.
246. Kim JW, Hong DY, Lee KR, Kim SY, Baek KJ, Park SO. Usefulness of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin concentration for predicting the severity and mortality of patients with community-acquired pneumonia. *Clin Chim Acta*. 2016;462:140-5.
247. Huang H, Ideh RC, Gitau E, Thézénas ML, Jallow M, Ebruke B, et al. Discovery and Validation of Biomarkers to Guide Clinical Management of Pneumonia in African Children. *Clin Infect Dis*. 15 de junio de 2014;58(12).
248. Liu C, Wang F, Cui L, Zhou J, Xu Z. Diagnostic value of serum neutrophil

- gelatinase-associated lipocalin, interleukin-6 and anti-citrullinated alpha-enolase peptide 1 for lower respiratory tract infections. *Clin Biochem.* 2020;75:30-4.
249. Nasioudis D, Witkin SS. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and innate immune responses to bacterial infections. *Med Microbiol Immunol.* 2015;204(4):471-9.
250. Xu SY, Pauksen K, Venge P. Serum measurements of human neutrophil lipocalin (HNL) discriminate between acute bacterial and viral infections. *Scand J Clin Lab Invest.* 1995;55(2):125-31.
251. Venge P. Human neutrophil lipocalin (HNL) as a biomarker of acute infections. *Ups J Med Sci.* 2018;123(1):1-8.
252. Li Bassi G, Rigol M, Marti J-D, Saucedo L, Ranzani OT, Roca I, et al. A Novel Porcine Model of Ventilator-associated Pneumonia Caused by Oropharyngeal Challenge with *Pseudomonas aeruginosa*. *Anesthesiology.* 2014;120(5).
253. Bartlett JG. Diagnostic test for etiologic agents of community-acquired pneumonia. *Infect Dis Clin North Am.* 2004;18(4):809-27.
254. Cilloniz C, Liapikou A, Torres A. Advances in molecular diagnostic tests for pneumonia. *Curr Opin Pulm Med.* 2020;26(3).
255. Ranzani OT, De Pascale G, Park M. Diagnosis of nonventilated hospital-acquired pneumonia. *Curr Opin Crit Care.* 2018;24(5).
256. Shengchen D, Gu X, Fan G, Sun R, Wang Y, Yu D, et al. Evaluation of a molecular point-of-care testing for viral and atypical pathogens on intravenous antibiotic duration in hospitalized adults with lower

Referencias

- respiratory tract infection: a randomized clinical trial. *Clin Microbiol Infect.* 2019;25(11):1415-21.
257. Hanson KE, Azar MM, Banerjee R, Chou A, Colgrove RC, Ginocchio CC, et al. Molecular Testing for Acute Respiratory Tract Infections: Clinical and Diagnostic Recommendations From the IDSA's Diagnostics Committee. *Clin Infect Dis.* 2020;71(10).
258. Moradi T, Bennett N, Shemanski S, Kennedy K, Schlachter A, Boyd S. Use of Procalcitonin and a Respiratory Polymerase Chain Reaction Panel to Reduce Antibiotic Use via an Electronic Medical Record Alert. *Clin Infect Dis.* 2020;71(7).
259. Murphy CN, Fowler R, Balada-Llasat JM, Carroll A, Stone H, Akerele O, et al. Multicenter Evaluation of the BioFire FilmArray Pneumonia/Pneumonia Plus Panel for Detection and Quantification of Agents of Lower Respiratory Tract Infection. *J Clin Microbiol.* 2020;58(7).
260. Kunze N, Moerer O, Steinmetz N, Schulze MH, Quintel M, Perl T. Point-of-care multiplex PCR promises short turnaround times for microbial testing in hospital-acquired pneumonia – an observational pilot study in critical ill patients. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2015;14(1):33.
261. Ozongwu C, Personne Y, Platt G, Jeanes C, Aydin S, Kozato N, et al. The Unyvero P55 'sample-in, answer-out' pneumonia assay: A performance evaluation. *Biomol Detect Quantif.* 2017;13:1-6.
262. Bard JD, Lee F. Why Can't We Just Use PCR? The Role of Genotypic versus Phenotypic Testing for Antimicrobial Resistance Testing. *Clin Microbiol Newsl.* 2018;40(11):87-95.

263. Akova M, Daikos GL, Tzouveleki L, Carmeli Y. Interventional strategies and current clinical experience with carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(5):439-48.
264. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(9):821-30.
265. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid Detection of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(9):1503-7.
266. Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-Carba, an Easy Biochemical Test for Detection of Diverse Carbapenemase Producers Directly from Bacterial Cultures. *J Clin Microbiol.* 2013;51(12):4281-3.
267. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid Identification of Carbapenemase Types in Enterobacteriaceae and Pseudomonas spp. by Using a Biochemical Test. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(12):6437-40.
268. Tijet N, Boyd D, Patel SN, Mulvey MR, Melano RG. Evaluation of the Carba NP Test for Rapid Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(9):4578-80.
269. Fernández-Cuenca F, Pascual Á, Ribera A, Vila J, Bou G, Miguel Cisneros J, et al. Diversidad clonal y sensibilidad a los antimicrobianos de Acinetobacter baumannii aislados en hospitales españoles. Estudio multicéntrico nacional: proyecto GEIH-Ab 2000. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22(5):267-71.
270. Fernández-Cuenca F, Tomás-Carmona M, Caballero-Moyano F, Bou G,

Referencias

- Martínez-Martínez L, Vila J, et al. Actividad de 18 agentes antimicrobianos frente a aislados clínicos de *Acinetobacter baumannii*: segundo estudio nacional multicéntrico (proyecto GEIH-REIPI-Ab 2010). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31(1):4-9.
271. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. [Internet]. 2019 [citado 7 de marzo de 2021]. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2018>
272. Isler B, Doi Y, Bonomo RA, Paterson DL. New Treatment Options against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;63(1).
273. Garnacho-Montero J, Dimopoulos G, Poulakou G, Akova M, Cisneros JM, De Waele J, et al. Task force on management and prevention of *Acinetobacter baumannii* infections in the ICU. *Intensive Care Med*. 2015;41(12):2057-75.
274. Cai Z, Tao J, Jia T, Fu H, Zhang X, Zhao M, et al. Multicenter Evaluation of the Xpert Carba-R Assay for Detection and Identification of Carbapenemase Genes in Sputum Specimens. *J Clin Microbiol*. 2020;58(9).
275. Reddy AK, Balne PK, Reddy RK, Mathai A, Kaur I. Loop-mediated isothermal amplification assay for the diagnosis of retinitis caused by herpes simplex virus-1. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(2):210-3.
276. Sugiyama H, Yoshikawa T, Ihira M, Enomoto Y, Kawana T, Asano Y.

- Comparison of loop-mediated isothermal amplification, real-time PCR, and virus isolation for the detection of herpes simplex virus in genital lesions. *J Med Virol.* 2005;75(4):583-7.
277. Kobayashi T, Yagami A, Suzuki K, Ihira M, Yoshikawa T, Matsunaga K. Clinical utility of loop-mediated isothermal amplification assay for the diagnosis of common alpha herpesvirus skin infections. *J Dermatol.* 2013;40(12):1033-7.
278. Kimura H, Ihira M, Enomoto Y, Kawada J, Ito Y, Morishima T, et al. Rapid detection of herpes simplex virus DNA in cerebrospinal fluid: comparison between loop-mediated isothermal amplification and real-time PCR. *Med Microbiol Immunol.* 2005;194(4):181-5.
279. Linssen CFM, Jacobs JA, Stelma FF, van Mook WNKA, Terporten P, Vink C, et al. Herpes simplex virus load in bronchoalveolar lavage fluid is related to poor outcome in critically ill patients. *Intensive Care Med.* 2008;34(12):2202.
280. Limaye AP, Kirby KA, Rubenfeld GD, Leisenring WM, Bulger EM, Neff MJ, et al. Cytomegalovirus Reactivation in Critically Ill Immunocompetent Patients. *JAMA.* 2008;300(4):413.
281. Lachance P, Chen J, Featherstone R, Sligl W. Impact of cytomegalovirus reactivation on clinical outcomes in immunocompetent critically ill patients: protocol for a systematic review and meta-analysis. *Syst Rev.* 2016;5(1):127.
282. Clavel M, Barraud O, Moucadel V, Meynier F, Karam E, Ploy M-C, et al. Molecular quantification of bacteria from respiratory samples in patients

Referencias

- with suspected ventilator-associated pneumonia. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(9):812.e1-812.e7.
283. Gadsby NJ, McHugh MP, Russell CD, Mark H, Conway Morris A, Laurenson IF, et al. Development of two real-time multiplex PCR assays for the detection and quantification of eight key bacterial pathogens in lower respiratory tract infections. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21(8):788.e1-788.e13.
284. Chastre J, Trouillet J, Combes A, Luyt C. Diagnostic Techniques and Procedures for Establishing the Microbial Etiology of Ventilator-Associated Pneumonia for Clinical Trials: The Pros for Quantitative Cultures. *Clin Infect Dis.* 2010;51(S1):S88-92.
285. Julián-Jiménez A, Timón Zapata J, Laserna Mendieta EJ, Sicilia-Bravo I, Palomo-de los Reyes MJ, Cabezas-Martínez Á, et al. Poder diagnóstico y pronóstico de los biomarcadores para mejorar el manejo de la neumonía adquirida en la comunidad en los servicios de urgencias. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32(4).
286. Vergara A, Fernández-Pittol MJ, Muñoz-Mahamud E, Morata L, Bosch J, Vila J, et al. Evaluation of Lipocalin-2 as a Biomarker of Periprosthetic Joint Infection. *J Arthroplasty.* 2019;34(1).
287. Esposito S, Bianchini S, Gambino M, Madini B, Di Pietro G, Umbrello G, et al. Measurement of lipocalin-2 and syndecan-4 levels to differentiate bacterial from viral infection in children with community-acquired pneumonia. *BMC Pulm Med.* 20 de diciembre de 2016;16(1).
288. Yu Z, Jing H, Hongtao P, Furong J, Yuting J, Xu S, et al. Distinction between

- bacterial and viral infections by serum measurement of human neutrophil lipocalin (HNL) and the impact of antibody selection. *J Immunol Methods*. mayo de 2016;432.
289. Yeh Y-H, Chang J-L, Hsiao P-C, Tsao S-M, Lin CH, Kao S-J, et al. Circulating Level of Lipocalin 2 As a Predictor of Severity in Patients With Community-Acquired Pneumonia. *J Clin Lab Anal*. julio de 2013;27(4).
290. Fine MJ, Auble TE, Yealy DM, Hanusa BH, Weissfeld LA, Singer DE, et al. A Prediction Rule to Identify Low-Risk Patients with Community-Acquired Pneumonia. *N Engl J Med*. 23 de enero de 1997;336(4).
291. Messacar K, Parker SK, Todd JK, Dominguez SR. Implementation of Rapid Molecular Infectious Disease Diagnostics: the Role of Diagnostic and Antimicrobial Stewardship. *J Clin Microbiol*. 2017;55(3).
292. Yang L, Haidar G, Zia H, Nettles R, Qin S, Wang X, et al. Metagenomic identification of severe pneumonia pathogens in mechanically-ventilated patients: a feasibility and clinical validity study. *Respir Res*. 2019;20(1).
293. Ruppé E, Baud D, Schicklin S, Guigon G, Schrenzel J. Clinical metagenomics for the management of hospital- and healthcare-acquired pneumonia. *Future Microbiol*. 2016;11(3).
294. Chanderraj R, Dickson RP. Rethinking pneumonia: A paradigm shift with practical utility. *Proc Natl Acad Sci*. 2018;115(52).

Programa de Doctorado en Medicina e Investigación Traslacional

CLÍNIC
BARCELONA
Hospital Universitari
Centre de Diagnòstic Biomèdic

ISGlobal
Barcelona
Institute for
Global Health

 UNIVERSITAT DE
BARCELONA

