

Detección de *Streptococcus pneumoniae* en niños con neumonía adquirida en la comunidad

Detection of *Streptococcus pneumoniae* in children with community-acquired pneumonia

Gabriela Kuszniierz,^I Yosena Chiani,^I Juan Rudi,^I Lucilla Ortellao,^{II} Diego Cantarutti,^{II} Judith Pierini,^{II} Raquel Cociglio,^{III} Natalia Sioli,^{II} Mónica Ricart,^{II} Vanina Solari,^{II} Gisela Carreño,^{III} Verónica Vera Garate,^I Jorgelina Gasparri^{III}

^IInstituto Nacional Enfermedades Respiratorias "Dr. Emilio Coni". Santa Fe, Argentina.

^{II}Hospital "Dr. José Bernardo Iturraspe". Santa Fe, Argentina.

^{III}Hospital de Niños "Orlando Alassia". Santa Fe, Argentina.

RESUMEN

Introducción: *Streptococcus pneumoniae* es el principal agente etiológico de la neumonía adquirida en la comunidad.

Objetivo: evaluar muestras de plasmas, sangre entera, glóbulos blancos y suero para detectar ácido desoxirribonucleico de *Streptococcus pneumoniae*.

Métodos: la técnica de reacción en cadena de la polimerasa anidada, detectó fragmentos del gen de la neumolisina en distintos componentes de la sangre en pacientes con neumonía adquirida en la comunidad.

Resultados: la técnica de reacción en cadena de la polimerasa fue positiva en 69 (27,7 %) de los 249 pacientes con neumonía adquirida en la comunidad. Sangre total fue positiva en 36 (14,4 %; IC del 95 %, 10-19 %) de 249 pacientes, plasma en 31 (12,4 %; IC del 95 %, 8-16 %), la capa leucocitaria en 29 (11,6 %; IC del 95 %, 8-16 %) y suero en 22 (8,8 %; IC del 95 %, 5-12 %). La positividad aumentó con la mayor utilización de tres o cuatro componentes de la sangre, y se observaron diferencias estadísticamente significativas. Mediante el uso de una única muestra (sangre entera), el 48 % de los casos confirmados hubiera permanecido sin confirmar; mientras que, utilizando suero, solo el 30 % de los casos habría sido diagnosticado.

Conclusión: este estudio muestra que el diagnóstico de la infección neumocócica invasiva en niños con neumonía adquirida en la comunidad requiere el uso de una combinación de varios componentes de la sangre. Las cuatro fracciones de la sangre son vitales para alcanzar la sensibilidad óptima y lograr el diagnóstico definitivo de todos los casos.

Palabra clave: *Streptococcus pneumoniae*; PCR; neumonía; sangre.

ABSTRACT

Introduction: *Streptococcus pneumoniae* is the main etiologic agent for community-acquired pneumonia.

Objective: to test plasma, whole blood, white blood cells and serum samples in order to detect *Streptococcus pneumoniae* deoxyribonucleic acid.

Methods: nested polymerase chain reaction technique detected pneumolysin gen fragments in several blood components from patients with community-acquired pneumonia.

Results: polymerase chain reaction was positive in 69 (27.7 %) of 249 patients with community-acquired pneumonia. Whole blood was positive in 36 patients (14.4 %; 95 % CI, 10-19 %) plasma in 31 (12.4 %; 95 % CI, 8-16 %), buffy coat in 29 (11.6 %; 95 % CI, 8-16 %) and serum in 22 (8.8 %; 95% CI, 5-12 %). Positivity increased with greater use of three or four blood components and statistically significant differences were found. By using a single sample (whole blood), 48 % of confirmed cases would have been undetected whereas the serum sample would have just diagnosed 30 % of cases.

Conclusions: this study proves that diagnosis of invasive pneumococcal infection in children suffering community-acquired pneumonia requires a combined use of several blood components. The four blood fractions are vital to attain optimal susceptibility and to make definitive diagnosis of all the cases.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*; polymerase chain reaction; pneumonia; blood.

INTRODUCCIÓN

Streptococcus pneumoniae o *S. pneumoniae* es un patógeno relevante en la etiología de la neumonía adquirida en la comunidad (NAC). El mejor conocimiento de la etiología de la neumonía es de vital importancia para la decisión terapéutica más apropiada.¹⁻³ Debido a que solo una proporción de casos pueden ser confirmados por técnicas convencionales, muchas veces, la neumonía neumococal puede estar subdiagnosticada. El aislamiento de *Streptococcus pneumoniae* en cultivo de sangre es una evidencia indirecta aceptable de la presencia de neumonía neumococal. El cultivo de sangre posee baja positividad (15-30 %), debido a la baja prevalencia de bacteriemia en la NAC, a la baja concentración de neumococo y a la terapia de antibiótico previa a la toma de muestra.^{4,5}

Estudios previos evaluaron el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de ácido desoxirribonucleico (ADN) de *S. pneumoniae* en sangre entera (SE), con resultados variables. Los métodos moleculares pueden facilitar la detección temprana de bacterias viables y no viables, y pueden detectar una pequeña proporción de patógenos en la muestra.⁶ El uso de PCR en SE para la detección de *Streptococcus pneumoniae* en pacientes con NAC, reportó una sensibilidad entre 55 y 100 %, dependiendo de los cebadores utilizados, del diseño de la PCR y del tipo de muestra clínica.⁷⁻¹³ La etiología no identificada provoca el uso inapropiado de antibióticos, la resistencia antibiótica, las reacciones adversas y aumenta los costos en salud.

Con el propósito de estudiar la fracción de sangre más apropiada para la detección de *Streptococcus pneumoniae* en pacientes con NAC, nuestro objetivo es evaluar muestras de plasmas (P), SE, glóbulos blancos (GB) y suero (S), para detectar ADN de *Streptococcus pneumoniae* por una técnica de PCR basada en el gen de la neumolisina en pacientes con NAC.

MÉTODOS

Un total de 249 niños con evidencia de NAC fueron admitidos en dos hospitales de la ciudad de Santa Fe, durante el período 2009-2012. En el estudio se incluyeron prospectivamente pacientes hospitalizados menores de 14 años, con signos clínicos compatibles y anomalías radiológicas consistentes con NAC, y pacientes en los cuales no se identificaron los virus respiratorios clásicos por inmunofluorescencia.

La NAC fue definida como una enfermedad respiratoria aguda, asociada con, al menos, dos de los síntomas siguientes: tos, disnea, dolor torácico, fiebre o hipotermia; así como hallazgos de auscultación de sonidos respiratorios anormales y rales, con signos clínicos de ocupación alveolar y confirmación radiológica. La evidencia radiológica de neumonía fue definida como la presencia de consolidación (opacidad densa o difusa, con o sin broncograma aéreo), otros infiltrados (densidad intersticial o alveolar irregular y lineal) o derrame pleural.

De cada paciente, fueron recolectados 3 mL de sangre para la obtención de la muestra de S y 6 mL de sangre en un tubo conteniendo ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). La fracción leucocitaria fue separada por centrifugación en gradiente de densidad (*Ficoll hypaque*), para separar los GB y el P, el mismo día de extracción de la muestra. El ADN bacteriano fue extraído de P, S, SE y GB, usando el *kit* QIAampBlood (Qiagen), siguiendo el protocolo del fabricante con un equipo automatizado QIAcube (Qiagen), dentro de las 24 h de admisión, y que luego fueron conservados a -20 °C.

Se empleó una técnica de PCR anidada, que detectó fragmentos del gen de la neumolisina. El primer *round* amplificó un fragmento de 348 pares de bases (pb), y el segundo de 208 pb. La mezcla de reacción de 20 µL contenía buffer PCR 1X, Cl₂Mg 2 mM, 0,2 mM de cada deoxynucleótido trifosfato, 0,5 µM de cada cebador y 1 U Taq ADN polimerasa y 3 µL de ADN. La amplificación fue realizada con los parámetros siguientes: 94 °C por 7 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 30 s, con un último ciclo de 72 °C por 7 min. El segundo *round* fue llevado a cabo usando las mismas condiciones, pero con los cebadores IIa y IIb.¹⁰ La PCR fue analizada usando electroforesis en gel de agarosa al 2 %, con visualización de los amplicones en equipo de detección y fotografía.

En cada reacción se incluyó un control positivo (*S. pneumoniae* ATCC 49619) y un control negativo (agua calidad molecular). Las muestras también fueron testeadas para la presencia del gen de la β -globina humano. Este gen es encontrado en células humanas, y fue utilizado como control interno en cada amplificación. Para este propósito, se utilizaron los cebadores BGF (5´-GCCAGTGCCAGAAGAGCCAA-3´) y BGR (5´-TTAGGGTTGCCATAACAGC-3´), que amplifican una región de 500 pb del gen de la β -globina humano.¹⁰ Se emplearon los procedimientos recomendados para evitar la contaminación. Una muestra conveniente de niños asintomáticos sin neumonía, fue evaluada para la detección de *Streptococcus pneumoniae*.

Los datos de los pacientes fueron recolectados de las historias clínicas, usando una planilla estandarizada que incluyó datos demográficos, curso y presentación clínica, enfermedades asociadas, hallazgos radiológicos y tratamiento. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral.

El análisis estadístico fue realizado mediante el *software* SPSS 20.0. La asociación entre resultados y variables clínicas fue determinado por la prueba chi cuadrado Mantel-Haenszel para comparar variables discretas, y la prueba Mann-Whitney para comparar variables continuas. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado de significancia estadística.

A fin de comparar las proporciones de resultados positivos de PCR entre los diferentes componentes de la sangre, se utilizó la prueba para muestras independientes con el ajuste de Bonferroni. El nivel de significación se calculó dividiendo el error global de tipo I, entre el número de pruebas a realizar.

RESULTADOS

Un total de 249 niños con NAC fueron incluidos en este estudio. La edad media de los pacientes fue 40,4 meses (rango 1-168); y 132 fueron del sexo masculino (53 %). Los grupos etarios se distribuyeron de la manera siguiente: 28 (11,2 %) < 6 meses; 129 (51,8 %) de 6 meses a 2 años; 33 (13,3 %) de 2 a 5 años; y >5 años, 59 (23,7 %).

Antes de la admisión al hospital, 68 pacientes (27,3 %) recibieron terapia antibiótica. El 79 % de los pacientes (197) recibió antibióticos previo a la toma de muestra. El 21,2 % presentó enfermedades preexistentes (53); 8 (3,2 %) requirieron remisión a la unidad de cuidados intensivos y uno falleció. En la [tabla 1](#) se detallan los hallazgos clínicos.

Todos los pacientes recibieron antibióticos durante la hospitalización; y los más frecuentemente usados fueron: ampicilina, penicilina, ceftriaxona y cefotaxima.

Analizando el total de 249 niños, el patrón alveolar estuvo presente en 207 niños (83,1 %), el patrón intersticial en 82 (32,9 %) y la atelectasia en 22 (8,8 %). En el grupo de pacientes con resultado de PCR positivo, el 84 % presentó un patrón alveolar, pero 16 % un patrón intersticial. El valor promedio de leucocitos al momento de la admisión fue de 18 290 leucocitos/mm³ (rango 500-88 300 leucocitos/mm³). A todos los pacientes se les realizó cultivo de sangre, de los cuales, 4 (1,6 %) resultaron positivos para *Streptococcus pneumoniae*.

Tabla 1. Características clínicas y resultados de PCR en pacientes con NAC

Características clínicas	Muestras positivas por PCR n= 69	Muestras negativas por PCR n= 180
Edad, meses y media (rango)	26,9 (2-156)	45,6 (1-168)
Condiciones preexistentes (no. y %)		
Enfermedad cardíaca congénita	4 (5,7)	4 (2,2)
Desnutrición	11 (15,9)	25 (13,9)
Inmunodeficiencia	2 (2,8)	5 (2,8)
Síndrome de Down	5 (7,2)	-
Prematuridad	9 (13,0)	18 (10)
Internaciones previas por IRA	27 (39,1)	81 (45)
Signos y síntomas (no. y %)		
Duración de síntomas previo toma de muestra, media y días (rango)	5,6 (1-42)	5,4 (1-26)
Taquipnea	52 (75,3)	160 (88,8)
Frecuencia respiratoria, minuto y media (rango)	50 (14-90)	43,5 (16-80)
Murmullo vestibular reducido	60 (86,9)	163 (90)
Rales subcrepitantes	49 (71,0)	104 (57,7)
Rales crepitantes	17 (24,6)	55 (30,5)
Tos	51 (73,9)	120 (66,6)
Saturación de oxígeno, media (rango)	93,9 (87-99)	94,1 (81-99)
Retracciones	39 (58,2)	90 (50,0)
Soplo tubario	3 (4,3)	11 (6)
Distensión abdominal	3 (4,3)	11 (6)
Fiebre	58 (84)	150 (83,3)
Hallazgos radiológicos (no. y %)		
Broncograma aéreo	30 (43,5)	88 (48,9)
Patrón intersticial	11 (16)	71 (39,4)
Derrame pleural	6 (8,7)	19 (10,6)
Patrón multilobular alveolar	18 (26,0)	45 (25)
Patrón unilobular alveolar	40 (57,9)	104 (57,7)
Consolidación	54 (78,2)	30 (17)
Atelectasias	7 (10,1)	15 (8,3)
Hallazgos de laboratorio (no. y %)		
Leucocitosis con neutrofilia	59 (85,5)	150 (83,3)
Recuento de leucocitos $\times 10^3/\text{mm}^3$, media (rango)	18,8 (11-41,3)	20,7 (10,4-64)
Recuento de leucocitos $> 15 \times 10^3/\text{mm}^3$	33 (47,8)	70 (38,8)
Tratamiento (no. y %)		
Oxígeno	44 (63,7)	110 (61,1)
Duración de oxígeno, mediana y días (rango)	4 (1-12)	4 (1-30)
Admisión a cuidados intensivos	3 (4,3)	5 (2,7)
Ventilación asistida	1 (1,4)	2 (1,1)
Antibióticos	69 (100)	180 (100)
Tiempo de hospitalización mediana y días (rango)	6 (1-33)	5 (1-41)
Tratamiento previo con antibióticos	52 (75,4)	145 (80,6)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa, NAC: neumonía adquirida en la comunidad, IRA: infección respiratoria aguda.

La técnica de PCR fue positiva en 69 (27,7 %; 95 % IC, 22-33 %) de 249 pacientes con NAC; y 28 niños (11,2 %; 95 % IC, 7-15 %) tuvieron más de un resultado positivo de PCR. La tasa de positividad disminuyó con la utilización de tres (24,1-22,9 %), dos (20,4-16,8 %) o un (14,4-8,8 %) componente de la sangre, variando de acuerdo con la fracción utilizada. En ninguno de los pacientes controles sanos fue encontrada positiva la PCR.

Un total de 41 pacientes presentaron un resultado positivo de PCR: 10 fueron P, 12 GB, 8 S y 11 SE. En la [tabla 2](#) se muestran los resultados de PCR positivos con el empleo de SE, P, S o GB como únicas muestras, o con combinaciones de dos, tres o cuatro de los diferentes componentes de la sangre. La SE fue positiva en 36 (14,4 %; 95 % IC, 10-19 %), de 249 pacientes, P en 31 (12,4 %; 95 % IC, 8-16 %), GB 29 (11,6 %; 95 % IC, 8-16 %) y S en 22 (8,8 %; 95 % IC, 5-12 %).

Tabla 2. Positividad de PCR en diferentes combinaciones de sangre

Muestras o combinaciones usadas	Pacientes con <i>S. pneumoniae</i> No. (%)
Sangre entera-suero-glóbulos blancos-plasma	69 (100)
Sangre entera-plasma-glóbulos blancos	60 (86,9)
Sangre entera-suero-plasma	57 (82,6)
Sangre entera-suero-glóbulos blancos	57 (82,6)
Sangre entera-glóbulos blancos	51 (73,9)
Sangre entera-plasma	48 (69,5)
Plasma-glóbulos blancos	48 (69,5)
Sangre entera-suero	45 (65,2)
Suero-plasma	44 (63,7)
Suero-glóbulos blancos	42 (60,8)
Sangre entera	36 (52,1)
Plasma	31 (44,9)
Glóbulos blancos	29 (42)
Suero	22 (31,8)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa,
ADN: ácido desoxirribonucleico.

La comparación de la tasa de positividad, con el empleo de un único componente en cada reacción de PCR, determinó que para SE se obtenga el mayor porcentaje de positividad; sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las tasas de los diferentes componentes ($p > 0,0083$). Con el uso de dos componentes, con la combinación de SE y GB, se detectó mayor cantidad de casos que con las otras variantes de dos combinaciones, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,003$). Con el empleo de tres componentes, con la combinación SE-P y GB, se detectó mayor positividad que en las otras variantes de tres combinaciones, aunque estas diferencias tampoco fueron estadísticamente significativas ($p > 0,016$).

Al comparar la positividad detectada con la utilización de los cuatro componentes de la sangre, considerando solamente el componente de mayor positividad, ya sea en un componente (SE: 52 %), dos componentes (SE-GB: 73,9 %), o tres componentes (SE-GB-P: 86,9 %), se observaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0,0083$), al emplear cuatro componentes con respecto a tres, dos o un componente; o tres componentes, con respecto a un componente. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las tasas de positividad con la utilización de tres con respecto a dos componentes, y dos con respecto a un componente.

Se evaluó la presencia de inhibidores en las muestras. En SE y en la fracción de GB la presencia de inhibidores influyó en los resultados de PCR, y se observaron diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, en P y S no se observaron diferencias estadísticamente significativas ([tabla 3](#)).

Tabla 3. Detección de inhibidores en sangre entera, glóbulos blancos, plasma y suero

Muestras	Detección de inhibidores No. (%)	Valor de p
Sangre entera	11 (15,9)	0,0001
Glóbulos blancos	28 (40,5)	0,0000
Plasma	3 (4,3)	0,11
Suero	7 (10,1)	0,06

No se encontró asociación entre resultados de PCR (combinando SE, S, GB y P) y tratamiento previo a la toma de muestra con antibióticos ($p = 0,36$), rales ($p = 0,08$), fiebre ($p = 0,89$), duración de los síntomas antes de la toma de muestra ($p = 0,8$), saturación de oxígeno ($p = 0,3$), o recuento de leucocitos $> 15 \times 10^3 / \text{mm}^3$ ($p = 0,35$). Sin embargo, existió asociación con la edad ($p = 0,001$) y la presencia de taquipnea ($p = 0,007$).

Los resultados de PCR positivos en SE ($p = 0,53$), S ($p = 0,12$), GB ($p = 0,63$) o P ($p = 0,18$) no estuvieron asociados con tratamiento previo con antibióticos.

Se encontró asociación entre los resultados positivos en muestras de GB con el valor de leucocitos. No hubo asociación entre los resultados de PCR en muestras de GB y edad, duración de los síntomas antes de la admisión, o tiempo de hospitalización y tratamiento previo a la toma de muestra con antibióticos ([tabla 4](#)).

Tabla 4. Asociación entre resultados de PCR en glóbulos blancos y variables clínicas

Variables clínicas	Glóbulos blancos positivos n= 29	Glóbulos blancos negativos n= 40	Valor de p
Edad, mediana y meses (rango)	24,4 (2-96)	30 (2-156)	0,48
Duración de síntomas antes de toma de muestra, media y días (rango)	5,4 (1-15)	5,3 (1-17)	0,98
Terapia antibiótica previa (%)	21 (72,4)	31 (77,5)	0,62
> 48 h después del inicio (%)	13 (44)	12 (30)	0,2
Recuento de leucocitos $\times 10^3/\text{mm}^3$, media (rango)	19,8 (11,7-41,8)	14,7 (1,6-30,8)	0,038
Tiempo de hospitalización, mediana y días (rango)	6 (1-14)	7 (3-33)	0,1

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

DISCUSIÓN

En este estudio se evaluaron muestras de P, SE, GB y S para detectar ADN de *S. pneumoniae* por la técnica de PCR en pacientes con NAC. La tasa de positividad de 27,7 %, disminuyó según la fracción utilizada, desde un 24,1 a 8,8 %, según se empleen tres, dos o un componente de la sangre. En la investigación de *Michelow* y otros⁹ y *Smith* y otros,¹² la tasa de positividad fue superior (44 y 56 %) utilizando P, SE, GB y SE, respectivamente. *Dagan* y otros¹⁴ reportaron un valor de 38 % usando muestras de S; mientras, *Toikka* y otros¹⁵ encontraron 12 (5,9 %) muestras positivas entre 201 muestras de S o GB. *Abdeldaim* y otros¹⁶ evaluaron la utilidad de la PCR en tiempo real en pacientes con NAC en P para diferentes secuencias de cebadores y sondas, y la tasa de positividad varió entre 26 y 42 %. La sensibilidad puede estar limitada, además, por la ausencia de bacteriemia en los pacientes en el momento de la extracción de la sangre, por los cebadores utilizados y la técnica molecular seleccionada.

El 59,4 % de los pacientes presentó un único resultado de PCR positivo, lo que implica que, si no se hubieran empleado las diferentes combinaciones, en el 40,6 % de los pacientes no se hubiera logrado obtener el diagnóstico. La mayor positividad utilizando un único componente, se obtuvo con SE, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa con respecto a los demás componentes. A pesar de ello, se puede sugerir que SE, podría ser la muestra más apropiada para la detección de *S. pneumoniae*, sobre todo, si se dispone de recursos económicos limitados para el diagnóstico.

Considerando el componente de mayor positividad en cada grupo de combinaciones, se observaron diferencias estadísticas significativas al emplear cuatro componentes con respecto a tres, dos o un componente; o tres componentes con respecto a uno solo. Estos hallazgos demuestran que la positividad aumenta con la mayor utilización de componentes de la sangre.

Escasos estudios evaluaron la utilidad de la PCR entre niños con NAC simultáneamente en diferentes componentes de la sangre, por lo cual, fue difícil disponer de información suficiente para comparar nuestros hallazgos. *Michelow* y otros⁹ observaron tasas más altas de resultados positivos entre GB y SE, que entre muestras de P. En su estudio, *Toikka* y otros¹⁵ usaron P, GB y S, pero la sensibilidad fue baja. *Rudolph* y otros⁷ reportaron una mayor tasa de positividad en GB que en sangre entera, a pesar que evaluaron un bajo número de muestras clínicas.

En concordancia con otros autores,^{7,9} la alta positividad encontrada en GB es posible debido a que las células fagocíticas concentran bacterias y material nuclear en la fracción de leucocitos de la sangre. *Ng* y otros,¹⁷ en el modelo murino de neumonía neumococal, demostraron que la PCR en muestras de GB fue más sensible que la PCR en P. En nuestro estudio, la PCR detectó ADN de *S. pneumoniae* en GB en 12 de los pacientes (17,4 %), cuyo resultado en SE, S y P fue negativo. En nuestro estudio se encontró asociación entre el recuento de leucocitos y la positividad en esa fracción.

La presencia de inhibidores podría ser una de las causas de los resultados negativos en alguna de las fracciones, tal como quedó demostrado en SE y en la fracción de GB. Otro factor que pudo haber contribuido a la variación de sensibilidad de la técnica, es la baja concentración de ADN, que no fue evaluado en el presente estudio.

La determinación de la muestra más apropiada para la detección de *Streptococcus pneumoniae* tiene importancia para incrementar la detección de los casos; pero, por otro lado, es necesario considerar que la utilización de uno o cuatro componentes de la sangre aumenta el costo de la determinación de la técnica de PCR, y además al requerir un paso adicional (la separación por gradiente de centrifugación de los diferentes componentes), la técnica es más laboriosa y extensa. Sin embargo, con la utilización de una única muestra, por ejemplo, usando SE, el 48 % de los casos hubiera permanecido sin confirmar, mientras que, si se utiliza únicamente S, se hubiera diagnosticado solo el 30 % de los casos.

A pesar que el 80 % de los casos recibieron terapia antibiótica previa a la toma de muestra, los resultados de PCR no se afectaron. Este hallazgo está en consonancia con otros autores,^{9,18,19} que demostraron que los resultados de PCR no están asociados a la terapia antibiótica previa, pero sí a la edad de los pacientes. Sin embargo, *Abdeldaim* y otros,¹⁶ y *Dagan* y otros¹⁴ encontraron que la sensibilidad de la PCR disminuyó por el uso previo de antibióticos.

El 16 % de los pacientes con resultado de PCR positiva, presentó entre los hallazgos radiológicos un patrón intersticial, lo cual podría ser un marcador de un proceso viral. Esto es factible, ya que si bien no se identificaron virus respiratorios en las muestras respiratorias de estos pacientes, es conocido que la inmunofluorescencia posee una sensibilidad limitada respecto de los métodos moleculares.

Nuestro estudio posee algunas ventajas. Evaluamos un grupo extenso de pacientes con NAC y efectuamos un exhaustivo análisis clínico, y una alta proporción de determinaciones (996) mediante la técnica de PCR, ya que a cada paciente se le realizaron cuatro ensayos de PCR con la incorporación de la metodología adicional de separación por gradiente de centrifugación, para la obtención de las diferentes fracciones de la sangre, lo cual implicó que la técnica fue más laboriosa y de mayor costo.

La principal limitación fue el escaso número de pacientes con cultivo de sangre convencional positivo. Estudios previos evaluaron el uso de la PCR para la detección de ADN en muestras de sangre, utilizando el cultivo de sangre como estándar de referencia. Nuestro diseño experimental no planteaba utilizar el cultivo de sangre como método de referencia, debido a su ya conocida baja sensibilidad, y por lo tanto, a la dificultad para disponer de un número adecuado de muestras positivas. La PCR anidada, descrita por *Murdoch* y otros,¹⁰ presenta una sensibilidad y especificidad adecuada, y es útil para la detección de ADN del *Streptococcus pneumoniae* en muestras de sangre. Sería interesante utilizar una PCR en tiempo real,²⁰ disponible en la actualidad, para evaluar los distintos componentes de la sangre.

En conclusión, la selección del componente de la sangre es fundamental en la sensibilidad de la técnica de PCR. Una combinación de tres o cuatro componentes de la sangre mejora la sensibilidad. Las cuatro fracciones de la sangre son vitales para alcanzar la sensibilidad óptima, y lograr el diagnóstico definitivo de todos los casos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Johansson N, Kalin M, Tiveljung-Lindell A, Giske CG, Hedlund J. Etiology of community-acquired pneumonia: increased microbiological yield with new diagnostic methods. *Clin Infect Dis*. 2010;50:202-9.
2. Gelfer G, Leggett J, Myers J, Wang L, Gilbert DN. The clinical impact of the detection of potential etiologic pathogens of community-acquired pneumonia. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015 Dec;83(4):400-6.
3. Jain S, Williams D, Arnold S, Ampofo K, Bramley A, Reed C, et al. Community-Acquired Pneumonia requiring hospitalization among U.S children. *N Engl J Med*. 2015;372:835-45.
4. Muñoz-Almagro C, Gala S, Selva L, Jordan I, Tarragó D, Pallares R, et al. DNA bacterial load in children and adolescents with pneumococcal pneumonia and empyema. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;30:327-35.
5. Sacchi CT, Fukasawa LO, Gonçalves MG, Salgado MM, Shutt KA, Carvalhanas TR, et al. Incorporation of Real-Time PCR into Routine Public Health Surveillance of Culture Negative Bacterial Meningitis in São Paulo, Brazil. *PLOS ONE*. 2011;6:e20675.
6. Johansson N, Kalin M, Tiveljung-Lindell A, Giske CG, Hedlund J. Etiology of community-acquired pneumonia: increased microbiological yield with new diagnostic methods. *Clin Infect Dis*. 2010 Jan 15;50(2):202-9.
7. Rudolph K, Parkinson A, Black C, Mayer LW. Evaluation of polymerase chain reaction for diagnosis of pneumococcal pneumonia. *J Clin Microbiol*. 1993;31(10):2661-6.

8. Lorente ML, Falguera M, Nogués A, González AR, Merino MT, Caballero MR. Diagnosis of pneumococcal pneumonia by polymerase chain reaction (PCR) in whole blood: a prospective clinical study. *Thorax*. 2000;55:133-7.
9. Michelow I, Lozano J, Olsen K, Goto C, Rollins N, Ghaffar F, et al. Diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* lower respiratory infection in hospitalized children by culture, polymerase chain reaction, serological testing, and urinary antigen detection. *Clin Infect Dis*. 2002;34(1):E1-11.
10. Murdoch D, Anderson T, Beynon K, Chua A, Fleming A, Laing R, et al. Evaluation of a PCR assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* in respiratory and non respiratory samples from adults with community-acquired pneumonia. *J Clin Microbiol*. 2003;41(1):63-6.
11. Mayoral C, Noroña M, Baroni R, Giani R, Zalazar F. Evaluation of a nested-PCR assay for *Streptococcus pneumoniae* detection in pediatric patients with community-acquired pneumonia. *Rev Argentina Microbiol*. 2005;37:184-8.
12. Smith M, Sheppard C, Hogan A, Harrison TG, Dance DA, Derrington P, et al. South West Pneumococcus Study Group on behalf of the South West Pneumococcus Study Group. Diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections in adults with bacteremia and community-acquired pneumonia: clinical comparison of pneumococcal PCR and Urinary antigen detection. *J Clin Microbiol*. 2009;47(4):1046-9.
13. Avni T, Mansur N, Leibovivi PM. PCR using blood for diagnosis of invasive pneumococcal disease: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol*. 2010;48(2):489-96.
14. Dagan R, Shriker O, Hazan I, Leibovitz E, Greenberg D, Schlaeffer F, et al. Prospective study to determine clinical relevance of detection of pneumococcal DNA in sera of children by PCR. *J Clin Microbiol*. 1998;36:669-73.
15. Toikka P, Nikkari S, Ruuskanen O, Leinonen M, Mertsola J. Pneumolysin PCR-based diagnosis of invasive pneumococcal infection in children. *J Clin Microbiol*. 1999;37(3):633-7.
16. Abdeldaim G, Herrmann B, Molling P, Holmberg H, Blomberg J, Olcén P, et al. Usefulness of real-time PCR for *lytA*, *ply*, and *Spn9802*, applied to plasma samples to detect pneumococcal pneumonia. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(8):1135-41.
17. Ng W, Olsen K, Lutsar I, Wubbel L, Ghaffar F, Jafri H, et al. Buffy coat PCR for diagnosis of experimental pneumococcal pneumonia. *APMIS*. 2000;108(11):729-33.
18. Wheeler J, Murphy OM, Freeman, Kearns AM, Steward M, Lee MJ. PCR can add to detection of pneumococcal disease in pneumonic patients receiving antibiotics at admission. *J Clin Microbiol*. 2000;38:3907.
19. Holter J, Müller F, Bjorang O, Samdal H, Marthinsen J, Jenum P, et al. Etiology of community-acquired pneumonia and diagnostic yields of microbiological methods: a 3-year prospective study in Norway. *BMC Infect Dis*. 2015;15:64.

20. Elberse K, van Mens S, Cremers AJ, Meijvis SC, Vlaminkx B, de Jonge MI, et al. Detection and serotyping of pneumococci in community acquired pneumonia patients without culture using blood and urine samples. BMC Infect Dis. 2015 Feb;13(15):56.

Recibido: 29 de febrero de 2016.

Aprobado: 8 de marzo de 2016.

Gabriela Kuszniarz. Instituto Nacional Enfermedades Respiratorias "Dr. Emilio Coni". Blas Parera 8 260 (3 000). Santa Fe, Argentina. Correo electrónico: kuszniarz@yahoo.com