

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE
CAMPUS DE SANT JOAN D'ALACANT
FACULTAD DE MEDICINA



Utilidad de una técnica de quimioluminiscencia (VirClia) en el diagnóstico serológico de pacientes con neumonía adquirida en la comunidad

**Trabajo Final de Máster en Enfermedades Infecciosas
y Salud Internacional**

Autora: Marta Berruezo Salas

Tutora: Victoria Ortiz de la Tabla Duccase

Sant Joan d'Alacant, Septiembre 2015

DOCUMENTO DEL VISTO BUENO DEL TUTOR

La Dra. Victoria Ortiz de la Tabla Ducasse, jefa del Departamento de Microbiología del Hospital Universitario de San Juan de Alicante, en calidad de tutora académica del Trabajo de Fin de Máster titulado “Utilidad de una técnica de quimioluminiscencia (VirClia) en el diagnóstico serológico de pacientes con neumonía adquirida en la comunidad” realizado por la alumna Marta Berruezo Salas en el Máster Universitario en Enfermedades Infecciosas y Salud Internacional informa favorablemente del mismo, dado que reúne las condiciones necesarias una vez examinado, dando el V^OB^O para su presentación y defensa.

En San Juan de Alicante, a 20 de agosto de 2015.




Victoria Ortiz de la Tabla Ducasse

RESUMEN

La neumonía adquirida en la comunidad (NAC) se trata de un problema sanitario de primer orden por su elevada morbimortalidad y se estima que alrededor de un 15% de ellas está causada por microorganismos considerados atípicos, que requieren una aproximación terapéutica diferente. Este estudio retrospectivo pretende diagnosticar etiológicamente pacientes con NAC causada por microorganismos atípicos (*Coxiella burnetii*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae*) mediante serología. VirClia, una técnica novedosa basada en quimioluminiscencia, ha sido el principal método diagnóstico utilizado con el objetivo de estudiar su rentabilidad en el laboratorio clínico. La técnica ha mostrado una excelente reproducibilidad y una concordancia aceptable con algunas de las técnicas comúnmente empleadas, que también han servido de apoyo en el diagnóstico. Se ha visto que existe una equivalencia entre índices altos obtenidos con VirClia y títulos únicos con IFI indicativos de infección, únicamente en los casos de *C. burnetii* y *L. pneumophila*, lo que aumenta considerablemente la rentabilidad de la técnica en el diagnóstico de los mismos. Finalmente, en un 56.3% de los pacientes se ha identificado la causa etiológica y un 9.92% presenta coinfección con otros microorganismos, siendo la técnica VirClia la que ha permitido identificar la mayoría de ellos.

PALABRAS CLAVE: Neumonía adquirida en la comunidad (NAC), microorganismos atípicos, diagnóstico serológico, quimioluminiscencia, VirClia.

ABSTRACT

The community-acquired pneumonia (CAP) is one of the main health problems for its high morbidity and mortality. About 15% of CAP is caused by atypical microorganisms, requiring a different therapeutic approach. This retrospective study aims to make an etiological diagnosis of patients with CAP caused by atypical microorganisms (*Coxiella burnetii*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae*) by serology. VirClia, a new technique based on chemiluminescence, has been the main method used in order to study its profitability in the clinical laboratory. The technique has shown excellent reproducibility and an acceptable concordance with some of the techniques commonly used, which have also been used to support the diagnosis. It has been seen an equivalence between high indexes obtained with VirClia and unique IFI titles that are indicative of infection, only for *L. pneumophila* and *C. burnetii*. It considerably increases the profitability of the technique in the diagnosis of those microorganisms. Finally, 56.3% of patients were etiologically diagnosed and 9.92% were co-infected with other microorganisms. VirClia technique identified most of them.

KEYWORDS: community-acquired pneumonia (CAP), atypical organisms, serological diagnosis, chemiluminescence, VirClia.

ÍNDICE

Documento del visto bueno del tutor

Resumen/Palabras clave

Abstract/Key words

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Principales microorganismos considerados atípicos causantes de NAC.....	7
1.2. Nuevas técnicas de diagnóstico serológico	10
2. OBJETIVOS	11
3. METODOLOGIA	11
3.1. Diseño del estudio	11
3.2. Pacientes y muestras	11
3.3. Diagnóstico etiológico. Criterios de infección aguda.	12
3.4. Análisis estadístico.....	13
4. PLAN DE TRABAJO	14
4.1. VirClia monotest	14
4.2. Técnicas referencia: IFI y microaglutinación.....	16
4.3. ELISA cuantitativo	17
5. RESULTADO	19
5.1. VirClia: resultados y estudio de reproducibilidad de la técnica.....	19
5.2. Concordancia con técnicas de referencia: IFI, ELISA cuantitativo y microaglutinación.....	21
5.3. Diagnóstico etiológico retrospectivo de los pacientes con NAC.	23
6. CONCLUSIONES.....	26
7. AGRADECIMIENTOS.....	28
8. BIBLIOGRAFÍA.....	28
8. ANEXO	32

1. INTRODUCCIÓN

La neumonía adquirida en la comunidad se trata de una infección en la población inmunocompetente que no está relacionada con una estancia hospitalaria y que afecta al tracto respiratorio inferior produciendo tos y/o dificultad respiratoria, con evidencia radiológica de infiltrado pulmonar^{1,2}. Constituye un problema sanitario de primer orden, tratándose de una de las principales causas de morbimortalidad en la población y su atención consume una parte importante de los recursos sanitarios⁴. A pesar de que existe diversidad en los datos que aportan los distintos estudios realizados, especialmente en la población estudiada y en cómo se ha calculado⁵, se estima una incidencia anual entre el 5 y el 11% de la población adulta en países europeos y ésta puede verse aumentada en función del consumo de alcohol y tabaco, malnutrición, en pacientes EPOC y en función de las estaciones, siendo además más común en edades extremas de la vida³⁻⁴. En España se estiman alrededor de 1.6-1.8 casos/1000 habitantes/años mayores de 14 años¹.

Las tasas de hospitalización en Europa varían mucho, en torno a 12-66%, y este rango tan amplio podría deberse a las diferencias en los servicios de atención sanitaria^{3,6}. Además, sobre el 1.2-10% necesitan ser tratados por una unidad de cuidados intensivos (UCI)^{3,8}. La NAC es la causa más frecuente de muerte por etiología infecciosa en los países desarrollados. La mortalidad global oscila entre 1 y 36.5%, aunque en general se puede decir que se sitúa en torno al 5%, tratándose de la sexta causa de muerte más frecuente en el mundo. Las variaciones se deben principalmente a la etiología, la forma de presentación de la neumonía y a las características del paciente^{1,7}.

La clasificación de la NAC se puede hacer en función de diferentes criterios anatomopatológicos, microbiológicos, radiológicos y clínicos. En el año 1938 surge el término de neumonía atípica para describir un cuadro clínico que no se manifestaba con una neumonía neumocócica⁹, con un comienzo más lento de los síntomas, fiebre moderada, tos seca irritativa y dificultad respiratoria en ocasiones. A diferencia de la neumonía clásica, cursa generalmente de forma subaguda sin importante afectación del estado general del paciente^{2,10}. Sin embargo, no es fácil diferenciarlas en función de los signos y síntomas ya que además de por el patógeno causal, la presentación clínica de la

NAC puede variar con la edad y la extensión de la enfermedad. Por este motivo, generalmente este término se utiliza para definir a la neumonía causada por microorganismos considerados atípicos como son *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*), *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*), *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*), *Coxiella burnetii* (*C. burnetii*) y los virus respiratorios¹¹. Es común encontrar manifestaciones extrapulmonares (mialgias, rinitis, faringitis y/o miringitis) en las infecciones causadas por estos microorganismos atípicos y las diferencias en los patrones de órganos que suelen verse afectados puede dar pistas a la hora de reconocer la causa etiológica. Además, entre un 20-30% de las NAC son causadas por infecciones mixtas de virus-bacteria o bacteria-bacteria, estando el neumococo implicado frecuentemente¹².

La importancia de las neumonías atípicas no es solo por su incidencia, ya que constituyen alrededor del 15% de las NAC, sino por la necesidad de una aproximación terapéutica diferente a las típicas, al tratarse de bacterias intracelulares o con características especiales que presentan una resistencia natural a los beta-lactámicos¹³, y también porque pueden ser causantes de NAC severas, especialmente en el caso de la *Legionella*¹².

El diagnóstico microbiológico es esencial a la hora de instaurar un tratamiento adecuado y conseguir reducir la elevada mortalidad de esta infección. Sin embargo, en aproximadamente un 40-60% de las NAC no se consigue determinar la etiología y únicamente puede ser diagnosticada por la clínica y las evidencias radiológicas². Los microorganismos atípicos no crecen fácilmente en los medio de cultivos habituales, y las limitaciones de sensibilidad y especificidad de las técnicas de diagnóstico microbiológico hace que se instaure un tratamiento empírico, lo que puede causar efectos adversos de los fármacos, aumento de los costes, un uso innecesario de antibióticos de amplio espectro o combinaciones de ellos y la aparición de resistencias^{3,14}. Además, la baja utilidad de muestras respiratorias o la dificultad para conseguir muestras de calidad, así como la baja sensibilidad de los hemocultivos, restringe el diagnóstico etiológico a pruebas serológicas de forma retrospectiva por seroconversión, y/o a técnicas moleculares, que tienen en general elevados costes¹⁴.

1.1. Principales microorganismos “atípicos” causantes de NAC

C. burnetii es un patógeno intracelular causante de la fiebre Q, con diferentes manifestaciones entre las que se incluye la neumonía. Para considerar a *C. burnetii* como posible causa de la NAC es recomendable conocer si el paciente ha estado en contacto con animales ya que el principal reservorio del microorganismo son las vacas, ovejas y cabras, por lo que se considera una zoonosis al infectar al ser humano de manera accidental¹⁵⁻¹⁶. La distribución, presentación y prevalencia de la enfermedad varía de forma notable, siendo en los meses de invierno donde se registran más casos de neumonía causada por este microorganismo. En España se considera una enfermedad endémica, principalmente en la zona norte y se puede destacar la elevada incidencia en el País Vasco, llegando a ser el la causa etiológica hasta en un 60% de las NAC¹⁶. También existe una diferencia significativa en la incidencia entre pacientes de medio rural y urbano¹⁷. La dificultad para el diagnóstico en cultivo hace que se utilicen otras técnicas para su diagnóstico, como la serología o la detección del ADN bacteriano mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), aunque no está disponible en todos los hospitales. Se utilizan de forma rutinaria métodos indirectos a partir de muestras sanguíneas para realizar técnicas de reacción de fijación del complemento (FC) o técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Éste último es el método considerado de referencia por ser rápido, sencillo, sensible y específico¹⁸.

Tras una infección por *C. burnetii*, el título de anticuerpos puede permanecer en niveles detectables durante meses o años, por eso es importante que para confirmar la infección actual se detecte una seroconversión, con un incremento significativo en el título de anticuerpos IgG en muestras séricas diferidas por 3-4 semanas, correspondientes a la fase aguda y a la fase de convalecencia de la enfermedad. También puede considerarse diagnóstico de infección aguda un único título de IgG cuando éste sea suficientemente alto y/o la presencia de anticuerpos IgM^{16,19}. Se han realizado estudios para comprobar la utilidad de la técnica ELISA y, aunque ha demostrado que puede ser utilizada como herramienta de cribado, para el diagnóstico y la confirmación de la infección se considera superior la técnica de IFI²⁰.

Chlamydophila pneumoniae es otro de los principales causas etiológicas de la NAC atípica, siendo muy común a nivel mundial. Se estima que la mayoría de la población se infecta por este microorganismo al menos una vez en la vida, y las reinfecciones son frecuentes²¹. Los estudios de seroprevalencia han mostrado que entre el 50-75% de la población adulta en España presenta un título de anticuerpos IgG igual o mayor a 1/16 frente a *C. pneumoniae*, y en torno a un 32% de la población presenta títulos por encima de 1/64²². Igual que en el caso de *C. burnetii*, se trata de un patógeno intracelular que dificulta su aislamiento en cultivo, y el diagnóstico se realiza mediante serología. Sin embargo, títulos bajos en muestras de suero no serían relevantes ya que habitualmente corresponderían a una infección pasada. Para confirmar el diagnóstico mediante serología es necesario comprobar que existe una seroconversión en muestras de suero pareadas, de fase aguda y fase convaleciente. Para la detección de anticuerpos frente a *C. pneumoniae*, la técnica considerada como “Gold standard” es la microinmunofluorescencia (MIF), por ser el método más sensible y específico, aunque su interpretación es subjetiva. Las técnicas de ELISA también son útiles, sobre todo las cuantitativas, generalmente como método de cribado²³.

En términos de severidad de la NAC, el microorganismo atípico más importante es *Legionella pneumophila*, por ser la causante de alrededor del 15% de hospitalizaciones en pacientes diagnosticados de NAC y con tasas de mortalidad del 5-6%²⁴⁻²⁵. Hay más de 50 especies de *Legionella* que causan infecciones en humanos. Sin embargo, en el 91% de los casos es *L. pneumophila* el patógeno etiológico y en un 84% de éstos se trata del serogrupo 1. Es una bacteria ambiental ampliamente distribuida en el medio acuático natural y, aunque la mayor parte de los casos ocurren de forma esporádica, en ocasiones aparece en forma de brotes epidémicos, sobre todo en los meses de verano²⁶. Desde el año 1995 se trata de una enfermedad de declaración obligatoria en España y en respuesta a un brote se debe seguir el procedimiento de control y vigilancia epidemiológica²⁷⁻²⁸. La incidencia en Europa varía mucho de unos países a otros, sobre todo en función de los sistemas de vigilancia, pero cabe destacar que en España existe una elevada incidencia en las zonas murciana, levantina y catalana, en comparación con el resto del país²⁹. El cultivo es difícil a partir de muestras respiratorias, aunque menos que en los casos anteriores dado que *Legionella* crece en medios de cultivo bacteriano

especiales, y habitualmente se diagnostica por detección de antígenos de *L. pneumophila serotipo I* en orina o bien por serología, siendo necesario evidenciar una seroconversión o bien un único título de anticuerpos de, al menos 1/128 por IFI, que es la técnica de referencia. El test de antígeno en orina detecta el lipopolisacárido mediante un inmunoensayo enzimático (EIA), con una sensibilidad del 65-100% y una especificidad del 94% y tiene un impacto clínico importante ya que ha permitido mejorar las tasas de diagnóstico correcto de neumonías. Sin embargo, la antigenuria se mantiene positiva varias semanas tras una infección por lo que es recomendable comprobar si existe respuesta serológica para confirmar el diagnóstico²⁹⁻³¹. Las técnicas moleculares como la PCR tiene mejor sensibilidad y especificidad al comparar con la serología, sin embargo aún están en desarrollo y, hasta la fecha, existe una experiencia clínica limitada^{24,31}.

Mycoplasma pneumoniae, patógeno intracelular facultativo, es una de las principales causas de NAC, especialmente en pacientes jóvenes y niños, pudiendo ser la causa de hasta 10-20% de las mismas. Sin embargo, los datos acerca de su incidencia pueden variar en función de si el estudio se ha realizado o no durante los años epidémicos, ya que suele aparecer en forma de epidemias cíclicas cada 3-7 años, y algunos estudios han mostrado que existe mayor frecuencia en las estaciones de verano-otoño^{2-3,33}. Debido a las elevadas tasas de seropositividad a títulos bajos de anticuerpos IgG en adultos, que pueden durar años en circulación, y también a que gran parte de las NAC en adultos por *M. pneumoniae* son reinfecciones y no existe una respuesta de IgM, se suele diagnosticar de forma retrospectiva mediante detección de una seroconversión evidente³⁴. Los estudios serológicos más utilizados en este caso son ELISA y PA (aglutinación de partículas), con sensibilidad y especificidad elevada³⁵.

De modo que, en términos generales, se requieren métodos diagnósticos alternativos al cultivo bacteriano para el diagnóstico de los principales microorganismos atípicos causantes de NAC, por tratarse de patógenos intracelulares que requieren de técnicas sofisticadas para su aislamiento. El estudio de seroconversión con un aumento significativo de anticuerpos IgG en muestras pareadas correspondientes a la fase aguda y a la fase convaleciente de la enfermedad, puede aportar un diagnóstico retrospectivo que aunque tiene limitaciones en la práctica clínica, es una herramienta muy útil para

realizar estudios epidemiológicos. Sin embargo, debido a la importante seroprevalencia de IgG de *C. pneumoniae* y *M. pneumoniae* en la población y a la no producción de IgM en segundas infecciones, supone a veces el único recurso para poder establecer un diagnóstico etiológico. Por otra parte, existe la posibilidad de realizar una aproximación diagnóstica teniendo en cuenta títulos altos de anticuerpos en función de un valor establecido frente a cada microorganismo, evaluando siempre la epidemiología local y la prevalencia del mismo en distintos grupos de edad³⁴.

1.2. Nuevas técnicas de diagnóstico serológico

Las técnicas más comúnmente empleadas para el diagnóstico serológico de estos microorganismos son el ELISA, IFI y en caso de *M. pneumoniae* también se utiliza la microaglutinación, aunque en los últimos años los métodos basados en ensayos de inmunoquimioluminiscencia (CLIA) están adquiriendo más importancia. Esta técnica, que aparece en los años 90s, ofrece una amplia sensibilidad y amplificación de la señal con menores tiempos de incubación. La técnica consiste en determinar la concentración de anticuerpos en suero, en función de la intensidad de la luminiscencia que emite la reacción química que implica³⁶. VirClia, de Vircell Microbiologists, se basa en esta técnica y ofrece gran variedad de ensayos disponibles para la detección de anticuerpos (IgG, IgM e IgA) para el diagnóstico de diferentes enfermedades infecciosas en formato monotest, entre las que se encuentran distintos microorganismos atípicos de la NAC como son *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *L. pneumophila serogrupo 1* y *C. burnetii*.

A pesar de que la técnica ha sido validada analíticamente no se ha comprobado su utilidad en la práctica clínica para conseguir un diagnóstico etiológico del paciente. Por ello, nos proponemos evaluar la rentabilidad diagnóstica de la técnica VirClia en pacientes con NAC. Para lograrlo, utilizamos una seroteca de pacientes diagnosticados de NAC por criterios clínico-radiológicos. Estudiamos los principales microorganismos bacterianos en la NAC considerados como atípicos, la reproducibilidad de la técnica VirClia y la concordancia existente entre ésta y otras técnicas de referencia al uso.

2. OBJETIVOS

El objetivo general que plantea el estudio es conseguir diagnosticar etiológicamente a pacientes con NAC de manera retrospectiva mediante serología, evaluando la rentabilidad de la técnica VirClia en este contexto.

Como objetivos específicos nos proponemos:

- Evaluar la reproducibilidad de la técnica VirClia en las distintas mediciones realizadas con las mismas muestras.
- Estudiar estas muestras pertenecientes a la seroteca, utilizando otros métodos de referencia (IFI, ELISA cuantitativo y/o microaglutinación), como intento de establecer una concordancia y esclarecer las posibles diferencias que se observan al compararla con los resultados obtenidos mediante la técnica VirClia.
- Establecer un diagnóstico etiológico de los pacientes con NAC incluidos en el estudio mediante serología y con el apoyo de las distintas técnicas empleadas.

3. METODOLOGIA

3.1. Diseño del estudio

El estudio realizado se trata de un estudio descriptivo retrospectivo a partir de una seroteca de pacientes con NAC, previamente diagnosticados por otros criterios clínicos y radiológicos, para determinar la existencia o no de seroconversión evidente frente a cuatro de los principales microorganismos responsables de la NAC y establecer así un diagnóstico etiológico utilizando la técnica novedosa basada en la quimioluminiscencia VirClia (Vircell Microbiologists).

3.2. Pacientes y muestras

El estudio se realiza empleando una seroteca propiedad de la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital General Universitario de Elche, obtenidas entre mayo de 2005 y diciembre de 2012 de un total de 252 pacientes mayores de 15 años que acuden al servicio de urgencias con síntomas que se asocian a una neumonía. Las muestras de suero fueron recogidas en el momento de la consulta y tras un periodo de 4 semanas, en

aquellos pacientes incluidos en otro estudio prospectivo que se desarrolla en el mismo hospital y que ha sido aprobado por el Comité Ético del hospital, tras informar a los pacientes y haber obtenido un consentimiento firmado previo.

Las características demográficas de los pacientes del estudio quedan resumidas en la **Tabla 1** (ver **Anexo**). Los criterios de inclusión considerados fueron fiebre y la presencia de síntomas respiratorios, con la evidencia de un infiltrado en la radiografía de tórax y un índice de severidad de neumonía ≤ 90 según el sistema PSI o Fine's. Los criterios de exclusión fueron alergia a macrólidos o quinolonas o fallos en el tratamiento previo, necesidad de terapia de oxígeno, absceso pulmonar, embarazo o periodo de lactancia, shock, factores de riesgo para neumonía por aspiración, incapacidad cognitiva o física y ausencia de un soporte social que permita el seguimiento del paciente.

Las muestras permanecieron a una temperatura de -80°C hasta el momento de ser transportadas al Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de San Juan de Alicante en enero de 2015, donde se llevó a cabo el análisis de las mismas.

3.3. Diagnóstico etiológico. Criterios de infección aguda.

El diagnóstico etiológico se realiza gracias a la detección de un aumento significativo en el título de anticuerpos o, en ocasiones, se puede establecer el diagnóstico también en base a un título único lo suficientemente alto para ser considerado significativo, en función del microorganismo.

Infección aguda según VirClia: Los criterios se han establecido según la información aportada por la empresa fabricante de los equipos diagnósticos Vircell Microbiologists (Granada, España) en función de los análisis llevados a cabo para la validación de la técnica, basado en detectar una seroconversión evidente. Estos corresponden a: 0= no se cumplen los criterios de infección aguda, 1= aumento en un 20% el índice de anticuerpos, 2= índice aumenta desde un valor considerado negativo (<0.9) a otro considerado positivo (>1.1), 3= aumento triple en el índice de anticuerpos. La presencia de altos índices de anticuerpos en ambas muestras se evalúa, comparándolas con otra técnica alternativa, con el fin de determinar si podrían ser indicativos de infección aguda

a pesar de no existir una variación entre ambas muestras que pueda considerarse como una seroconversión en función de los criterios establecidos.

Infección aguda según ELISA cuantitativo y microaglutinación: únicamente se tiene en cuenta la presencia de una seroconversión evidente, según los criterios empleados: 0=no hay evidencia de infección aguda, 1=aumento cuádruple del título de anticuerpos.

Infección aguda según IFI: se considera que existe una evidencia de infección aguda cuando se produce un aumento cuádruple en el título de anticuerpos frente *C. pneumoniae* o bien presencia de un único título suficientemente elevado en los caso de *L. pneumophila* y *C. burnetii*, en los que un título único igual o mayor a 1/128 es considerado significativo. Para *C.pneumoniae* no está definido un título único como significativo ya que la población general sana presenta títulos variables en función de la zona geográfica, por lo que es necesario evidenciar una variación de los títulos de ambas muestras o bien detectar IgM para poder diagnosticar una infección aguda por este microorganismo. Para *M. pneumoniae* no se utiliza IFI como técnica serológica. Por lo tanto los criterios establecidos son: 0= no existe evidencia de infección aguda, 1= título único mayor o igual a 1/128 (en *L. pneumophila* y *C. burnetii*); 2= aumento cuádruple del índice de anticuerpos.

A la hora de establecer un diagnóstico etiológico final de cada uno de los pacientes incluidos en el estudio, se tienen en cuenta también los datos obtenidos a partir de aislamientos en esputo, aislamientos en hemocultivo, detección de antígenos en orina de *Streptococcus pneumoniae* y *Legionella pneumophila*, que estaban incluidos en la base de datos utilizada, así como la interpretación de los resultados de la detección de anticuerpos de tipo IgM que se realizó de manera sistemática como datos adicionales en las muestras analizadas por la empresa Vircell Microbiologists (Granada, España), junto con los resultados obtenidos en la detección de los anticuerpos IgG por las diversas técnicas empleadas.

3.4. Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los datos obtenidos se lleva a cabo con el programa estadístico IBM SPSS Statistics para Windows (versión 18). Desde el punto de vista matemático, el

índice más apropiado para cuantificar la concordancia entre dos o más métodos u observaciones y evaluar la reproducibilidad de la técnica VirClia es el llamado coeficiente de correlación intraclase (ICC). El ICC es una formulación especial del coeficiente de correlación (ρ) de Pearson, que se utiliza cuando las variables son numéricas continuas, y permite evaluar la reproducibilidad de varias mediciones cuando la distribución de los datos es normal. Los datos empelados para este propósito son los correspondientes a los índices de anticuerpos IgG frente a *C.pneumoniae* y *M. pneumoniae*, ya que se cuenta con un número de muestras considerable ($n>50$) y siguen una distribución normal, comprobado mediante el test de contraste de normalidad Kolmogorov-Smirnov ($p<0.05$)³⁷.

A la hora de evaluar la concordancia existente entre la técnica VirClia y el resto de técnicas utilizadas (ELISA cuantitativa, IFI y microaglutinación), se calcula el índice kappa (κ) al tratarse de variables categóricas, codificadas como 0= no hay evidencia de infección aguda y 1= evidencia de infección aguda. Kappa se define como la proporción del acuerdo observado que excede la proporción por azar. Asimismo, el p-valor indica si el valor del índice kappa es significativamente diferente a cero y, por lo tanto, sí existe un acuerdo entre los datos obtenidos por las dos técnicas. La interpretación cualitativa del índice kappa que se sigue y que es la utilizada clásicamente, propuesta por Landis y Koch en 1977, es 0= pobre, 0,01 - 0,20= leve, 0,21 - 0,40 = aceptable, 0,41 - 0,60= moderada, 0,61 - 0,80= considerable y 0,81 - 1,00= casi perfecta³⁷⁻³⁸.

4. PLAN DE TRABAJO

4.1. VirClia monotest

Se realizan inmunoensayos quimioluminiscentes indirectos (CLIA) con el fin de determinar anticuerpos IgG específicos frente a los microorganismos atípicos causantes de NAC (*Coxiella burnetii*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* serogrupo 1 y *Mycoplasma pneumoniae*) utilizando la técnica VirClia (Vircell, S.L., Granada, España). Los reactivos se conservan a 8-10 °C y se mantienen a temperatura

ambiente al menos medio hora antes de su uso como indica el protocolo. Se siguen las instrucciones del fabricante para el análisis de las muestras.

La técnica VirClia permite realizar 24 test de forma simultánea en cada ensayo, con una duración mínima de 50 min y máxima de 2h10min, ya sean diferentes mediciones en una misma muestra o en muestras diferentes. Los reactivos están dispuestos en forma de tiras con tres pocillos de reacción y cinco de reactivos, entre los que se incluyen un control positivo y un calibrador. El aparato, además de los marcos donde se disponen las tiras reactivas y la gradilla para colocar las muestras cuenta con una cámara interna que permite observar el proceso. El método se basa en la reacción de los anticuerpos presentes en la muestra, el suero del paciente en nuestro caso, con el antígeno que está unido a la superficie de poliestileno. En el proceso de lavado se eliminan las inmunoglobulinas no unidas, posteriormente la anti-Ig humana reacciona con el complejo formado y el resto es eliminado en los lavados. La anti-Ig humana reacciona con un sustrato quimioluminiscente y genera una luminiscencia que puede ser medida gracias a un luminómetro que lleva incorporado. Los resultados de la técnica son dados en forma de índice, calculado mediante algoritmos internos del aparato, en función de esta luminiscencia: índice $<0,9$ = resultado negativo, índice $0,9-1,1$ =resultado dudoso u equívoco e índice $>1,1$ = resultado positivo.

Con el fin de evitar costos excesivos, se realizó primero la detección de anticuerpos IgG en las muestras correspondientes a la fase de convalecencia de cada paciente. En las muestras que presentaron un índice $<0,9$ (negativo), se consideró que el paciente no habían generado una respuesta inmunológica y, por lo tanto, tampoco presentarían índices positivos de anticuerpos en la fase aguda de la enfermedad y podíamos excluir el diagnóstico. Únicamente en aquellos sueros de pacientes que presentaron un índice considerado positivo para alguno de los patógenos incluidos en el estudio (índice $>1,1$), se llevó a cabo la detección de IgG frente al mismo en la muestra correspondiente a la fase aguda, con el fin de determinar si existe un aumento significativo en el índice de anticuerpos específico, concluir si se ha producido una seroconversión y establecer un diagnóstico etiológico.

Por otra parte, las dos muestras de los pacientes que presentaron títulos positivos de IgG en la fase convaleciente, fueron analizadas de nuevo por la técnica VirClia, esta vez en el laboratorio de la empresa fabricante de los reactivos Vircell Microbiologists (Granada, España), con el objetivo de poder evaluar la reproducibilidad de la técnica.

4.2. Técnicas referencia: IFI y microaglutinación

Para cada uno de los microorganismos, se seleccionó una cantidad representativa de muestras que presentaban por VirClia resultados de anticuerpos a índices bajos, intermedios y/o altos, intentando hallar una correlación con los resultados obtenidos con el uso de las técnicas comúnmente empleadas en el diagnóstico clínico de los distintos microorganismos. Todas las muestras con índices positivos por VirClia frente a *C. burnetii* y *L. pneumophila* se incluyeron en esta selección ya que se trataba de un número reducido, con el intento de determinar si los índices altos corresponden a títulos igual o mayor a 1/128 por IFI.

En el caso de *M. pneumoniae*, se estudió la equivalencia con los resultados obtenidos mediante microaglutinación, que es una de las técnicas más utilizadas para el diagnóstico de este microorganismo en los laboratorios clínicos (**Tabla 2**, ver **Anexo**). No encontramos concordancia entre ellos, y una hipótesis del porqué ocurre esto, es que mediante la técnica de microaglutinación se detectan sobre todo anticuerpos de tipo IgM (anticuerpos aglutinantes). La respuesta IgM se da especialmente en una primoinfección, que suele darse en pacientes pediátricos. Sin embargo, este estudio ha sido realizado con muestras de pacientes adultos, por lo que la gran mayoría de los casos no presenta respuesta de este tipo, y esto puede ser el motivo por el que no se observa una equivalencia entre las dos técnicas. Por ello, decidimos utilizar ELISA cuantitativo como técnica alternativa de comparación en el diagnóstico por las dos técnicas y las muestras fueron procesadas para tal fin en la empresa Vircell Microbiologists (Granada, España).

Por otra parte, utilizamos IFI (Vircell, S.L., Granada, España) en aquellas muestras positivas para el resto de microorganismos estudiados, *C. pneumoniae*, *L. pneumophila* y/o *C. burnetii*, dado que ésta es la técnica de referencia para el diagnóstico serológico en las tres bacterias. Utilizamos el protocolo de la técnica IFI proporcionado por la casa

comercial (Vircell S.L., Granada), en un ensayo de micro-inmunofluorescencia indirecta (MIF) que se realiza en una placa multipocillo. La primera dilución de la muestra en PBS corresponde a 1:8 y se realizan diluciones seriadas 1:2 que permiten tener un valor cuantitativo que, en ocasiones, es muy orientador para el diagnóstico. Se utilizan portaobjetos que contienen cuerpos elementales específicos del microorganismo en cuestión. En el caso de *C. pneumoniae* el kit incluye otras dos especies adicionales de *Chlamydia* (*C. traichomatis* y *C. psitacii*) en pocillos individuales para facilitar el diagnóstico diferencial. Una vez los anticuerpos presentes en la muestra se han unido a los antígenos del portaobjetos y se ha llevado a cabo la incubación y los lavados necesarios, se añade el anticuerpo secundario fluorescente que permite su lectura utilizando el microscopio de fluorescencia.

Igual que con *M. pneumoniae*, se estudió la equivalencia entre índices obtenidos con VirClia y los títulos por IFI frente a los tres patógenos (**Tablas 3, 4 y 5**, ver **Anexo**). Aunque no pudo determinarse una equivalencia entre los niveles de anticuerpos frente a *C. pneumoniae* sí se consiguió en los casos de *L. pneumophila* y *C. burnetii*, en las que se observa una clara equivalencia entre índices de anticuerpos positivos detectados con la técnica VirClia y títulos únicos igual o mayores a 1/128 detectados mediante IFI, que evidencian una infección aguda. Por este motivo, se podría considerar como criterio diagnóstico la presencia de estos altos índices por VirClia, únicamente para el diagnóstico de estos dos microorganismos, ya que equivalen a títulos aceptados como criterio diagnóstico mediante IFI, la técnica de referencia. Se analizaron también por ELISA cuantitativo las muestras con índices positivos frente a *Chlamydomphila pneumoniae* en base a un aumento en el títulos de anticuerpos entre la muestra de la fase aguda y la de convalecencia, igual que en el caso de *M.pneumoniae*.

4.3. ELISA cuantitativo

Las muestras con resultado positivo por VirClia en la fase convaleciente de anticuerpos frente a *C.pneumoniae* y *M.pneumoniae* fueron evaluadas con la técnica ELISA cuantitativo (Vircell, S.L., Granada, España) en la propia empresa. En este caso, se estudiaron en paralelo las muestras de fase aguda y convaleciente.

4.4. Limitaciones del estudio

En este estudio hemos utilizado la técnica VirClia como cribado, seleccionado con ella aquellos pacientes que presentaban un resultado positivo en la muestra de suero correspondiente a la fase de convalecencia. Se ha considerado que debido a la elevada sensibilidad que ha mostrado la técnica VirClia en los ensayos para la validación de la misma en la detección de anticuerpos frente a los microorganismos estudiados, la pérdida de pacientes que tendrían una infección aguda producida por alguno de ellos ha sido mínima en comparación con la reducción de los costes que ha supuesto la estrategia empleada.

Por otra parte, también sería recomendable analizar las muestras pareadas en paralelo, para que estén bajo las mismas condiciones. En este caso, un aumento de al menos un 10% del índice de anticuerpos sería indicativo de seroconversión. Sin embargo, el hecho de realizar las mediciones de las muestras pareadas por separado hace que pueda existir un mayor error y para compensarlo, se ha considerado que uno de los criterios para determinar la presencia de seroconversión es un aumento de al menos un 20% en el índice de anticuerpos frente al microorganismo en cuestión.

Además, es posible que durante el proceso de descongelación y congelación de las muestras se hayan visto afectados los anticuerpos, desnaturalizándose e impidiendo que sean detectados. Se ha intentado en todo momento que esto afecte lo mínimo posible, aunque este problema ha podido ser causa de algunas de las discrepancias halladas entre las distintas mediciones o entre las medidas con distintas técnicas.

5. RESULTADO

5.1. VirClia: resultados y estudio de reproducibilidad de la técnica.

De las 252 muestras correspondientes a la fase convaleciente de cada paciente, se hizo un cribado para detectar índices positivos de anticuerpos IgG frente a los cuatro microorganismos. Un total de 55 muestra resultaron negativas para todos los microorganismos estudiados. Únicamente un paciente dio resultado positivo frente a *C. burnetii* y al realizar la detección en la muestra de la fase aguda se mantuvo el índice positivo, por lo que no puede considerarse la existencia de una seroconversión. No obstante, al presentar índices positivos de anticuerpos, y siendo poco común presentar anticuerpos remanentes frente a este microorganismos de una infección pasada por ser poco prevalente en nuestro entorno, se puede decir que el paciente pudo ser diagnosticado por VirClia al haber comprobado la equivalencia con títulos único elevados tomados como criterio diagnóstico según la técnica IFI.

La detección de índices positivos frente a *C.pneumoniae* y *M. pneumoniae* fueron mayoritarias, como se esperaba por la elevada prevalencia de éstos en nuestra región, por lo que pueden quedar títulos detectables de anticuerpos IgG que se mantienen durante largos periodos de tiempo y que no son indicativos de una infección aguda si no existe aumento significativo de los anticuerpos. Las muestras correspondientes a la fase aguda fueron analizadas de igual manera y los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 6**. Los datos fueron evaluados en función de los criterios establecidos, como el aumento significativo de anticuerpos indicando una infección aguda o también la presencia de índices altos, que a raíz de la equivalencia hallada con IFI en *L.pneumophila* y *C. burnetii*, han podido ser considerados criterio diagnóstico de la infección por la técnica VirClia.

En la evaluación de la reproducibilidad de la técnica, empleando el índice de correlación intraclassa (ICC), se analizan los datos obtenidos en la primera medición realizada en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de San Juan de Alicante frente a los resultados de la segunda medición proporcionados por la empresa Vircell Microbiologists. La correlación de los mismos queda reflejada mediante un gráfico de dispersión en la **Figura 1** (ver **Anexo**). Los resultados de la detección de anticuerpos

Tabla 6. Resultados obtenidos con la técnica VirClia monostest. (a) Resultados en función de las muestras correspondientes a la fase convaleciente y aguda. (b) Número de pacientes, analizadas las muestras pareadas, clasificados en cada uno criterios de infección aguda establecidos para esta técnica.

(a)

Microorganismo	Muestras de fase convaleciente (n=252)		Muestras de fase aguda		
	Índice negativo	Índice positivo ^a	N ^b	Índice positivo	Índice negativo
<i>Coxiella burnetii</i>	251	1	1	1	0
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	137	115	113	104	9
<i>Legionella pneumophila</i>	241	11	10	8	2
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	111	141	138	97	41

^a Índices positivos varios microorganismos: *C.pneumoniae-L.pneumophila* (2), *C.pneumoniae-L.pneumophila-M.pneumoniae* (3), *C.pneumoniae-M. pneumoniae* (61), *C. burnetii-M.pneumoniae* (1)

^b Total de muestras analizadas de fase aguda. Falta muestra: *C.pneumoniae* (2), *L. pneumophila* (1), *M. pneumoniae* (3).

(b)

Microorganismo	Criterios de infección aguda en VirClia ^a					Títulos altos	Total con infección aguda
	0	1	2	3			
<i>Coxiella burnetii</i>	0	0	0	0	1	1	
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	77	28	7	1		36	
<i>Legionella pneumophila</i>	0	0	0	2	8	10	
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	75	23	9	31		63	

^a 0=sin evidencia de infección aguda, 1=aumento en 20% del índice de IgG, 2=índice negativo aumenta a índice positivo, 3=aumento triple en el índice de anticuerpos IgG, Títulos altos: criterio establecido a posteriori, tras comprobar la equivalencia entre títulos altos y criterios según IFI, en *C. burnetii* y *L.pneumophila*.

frente a *C. pneumoniae* y *M. pneumoniae* fueron divididos entre los datos correspondientes a la muestra de la fase aguda y los de la fase convaleciente, mostrando unos ICC=0.737 y 0.661 en *C. pneumoniae*, y ICC=0.777 y 0.792, *M. pneumoniae*, respectivamente (Tabla 7). Estos datos indican que existe una buena correlación en todos ellos, e incluso se hablaría de una correlación calificada como excelente si tenemos en cuenta el intervalo de confianza de los ICC.

5.2. Concordancia con técnicas de referencia: IFI, ELISA cuantitativo y microaglutinación.

Tras las mediciones realizadas de las muestras correspondientes a la fase convaleciente que dieron resultados positivos en VirClia y las respectivas muestras de la fase aguda con las distintas técnicas empleadas en función del microorganismo, se estableció la presencia o ausencia de infección aguda según los criterios establecidos para cada una de ellas (**Tabla 8**, ver **Anexo**).

En el único caso que hemos encontrado de *C. burnetii*, el hecho de que no exista una seroconversión evidente pero sí un índice elevado de anticuerpos, que se correlaciona perfectamente con un título igual o superior a 1/128 en la técnica IFI, lleva a pensar que al incluir como criterio diagnóstico según VirClia la presencia de índices de IgG elevados se podrían diagnosticar este tipo de paciente, aumentando la rentabilidad de la técnica diagnóstica por quimioluminiscencia sin necesidad de realizar la IFI.

El ELISA cuantitativo en las muestras analizadas ha detectado 6 infecciones por *C. pneumoniae*, 2 por *L. pneumophila* y 41 por *M. pneumoniae*. En el caso de la microaglutinación en *M. pneumoniae* y la IFI en *C.pneumoniae* sólo se ha estudiado en las muestras que fueron evaluadas por estas técnicas a la hora de buscar una correlación, detectado una infección por *M. pneumoniae* y 4 por *C.pneumoniae*. Sin embargo, la IFI realizada en las muestras con índices positivos para *L. pneumophila* ha permitido detectar 10 infecciones por este patógeno.

Tabla 7. Coeficiente de correlación intraclase estimado para evaluar la reproducibilidad de los resultados obtenidos con la técnica VirClia en dos mediciones independientes.

Medida	Fiabilidad o confiabilidad	
	ICC	IC 95%
<i>C. pneumoniae</i>		
Fase aguda	0,737	0,639-0.811
Fase convaleciente	0.661	0.543-0.754
<i>M. pneumoniae</i>		
Fase aguda	0.777	0.701-0.835
Fase convaleciente	0.792	0.724-0.849

*Lectura de los valores de ICC: <0.4=baja fiabilidad, 0.5-0.75 concordancia moderada-buena, >0.75 concordancia excelente.

Al comparar el número de infecciones detectadas con las técnicas empleadas y la técnica quimioluminiscente VirClia, calculamos el nivel de concordancia según el valor del índice kappa (κ), (**Tabla 9**), a partir de la tabla de contingencias para cada técnica y microorganismo (**Tablas 10 y 11**, ver **Anexo**).

En el caso de *C. pneumoniae*, se observa una concordancia estadísticamente significativa entre las técnicas VirClia e IFI que, aunque presenta notables diferencias en el diagnóstico de los pacientes, puede calificarse como una concordancia aceptable ($\kappa=0.357$). Sin embargo, la técnica VirClia ha sido capaz de detectar 31 infecciones no detectadas por ELISA cuantitativo, mostrando una concordancia muy pobre ($\kappa=0.114$) que no puede ser considerada estadísticamente significativa.

Es necesario hacer especial hincapié en que la concordancia entre el número de infecciones causadas por *L.pneumophila* que han sido detectadas por IFI y por VirClia es total, ya que en todos los pacientes se ha podido confirmar por a ambas técnicas. Además de tener en cuenta criterios establecidos en un principio, es decir, la detección de un aumento en el índice de anticuerpos IgG que pueda ser considerado significativo, también se incluyen aquellos con índices altos, ya que se observa una clara equivalencia entre éstos y títulos únicos iguales o superiores a 1/128 con la técnica de referencia (IFI) que evidencia la presencia de una infección aguda, del mismo modo que ocurre con el caso de *C. burnetii*. Por lo tanto, concluimos que la concordancia real entre ambas técnica sería prácticamente total (κ no mostrado).

Tabla 9. Concordancia calculada mediante el índice Kappa entre las distintas técnicas empleadas para *C. pneumoniae* y *M.pneumoniae* y la técnica VirClia.

Microorganismo y técnica empleada	Índice Kappa	p_valor de Kappa
<i>C.pneumoniae</i>		
IFI	0.357	<0.05
ELISA cuantitativo	0.114	0.054
<i>M. pneumoniae</i>		
Microaglutinación	0.103	0.234
ELISA cuantitativo	0.609	<0.05

Al evaluar la concordancia entre las técnicas de microaglutinación y VirClia, se observa una concordancia muy pobre ($\kappa=0.103$) que puede considerarse nula ya que no es significativa. Según nuestra hipótesis, podría deberse a que los anticuerpos aglutinantes son, en mayor parte, IgM y éstos se detectan en los casos en los que se produce una primoinfección. Al realizar el estudio con pacientes adultos, los casos de primoinfecciones son escasos ya que la mayor parte de los pacientes habrán sufrido alguna infección por este microorganismo a lo largo de su vida y no producirán una respuesta IgM en una nueva infección.

Sin embargo, las infecciones agudas diagnosticadas mediante la presencia de un aumento significativo en el título de anticuerpos frente a *M. pneumoniae* detectadas con la técnica ELISA cuantitativo, muestran un nivel de concordancia bueno ($\kappa=0.609$) al comparar con la técnica VirClia, aunque ésta ha sido capaz de detectar un total de 24 infecciones más que más que ELISA.

5.3. Diagnóstico etiológico retrospectivo de los pacientes con NAC.

El diagnóstico etiológico de los pacientes se lleva a cabo mediante la interpretación en conjunto de todos los datos que se han obtenidos tras el análisis de las muestras de la seroteca empleada con las distintas técnicas de serología.

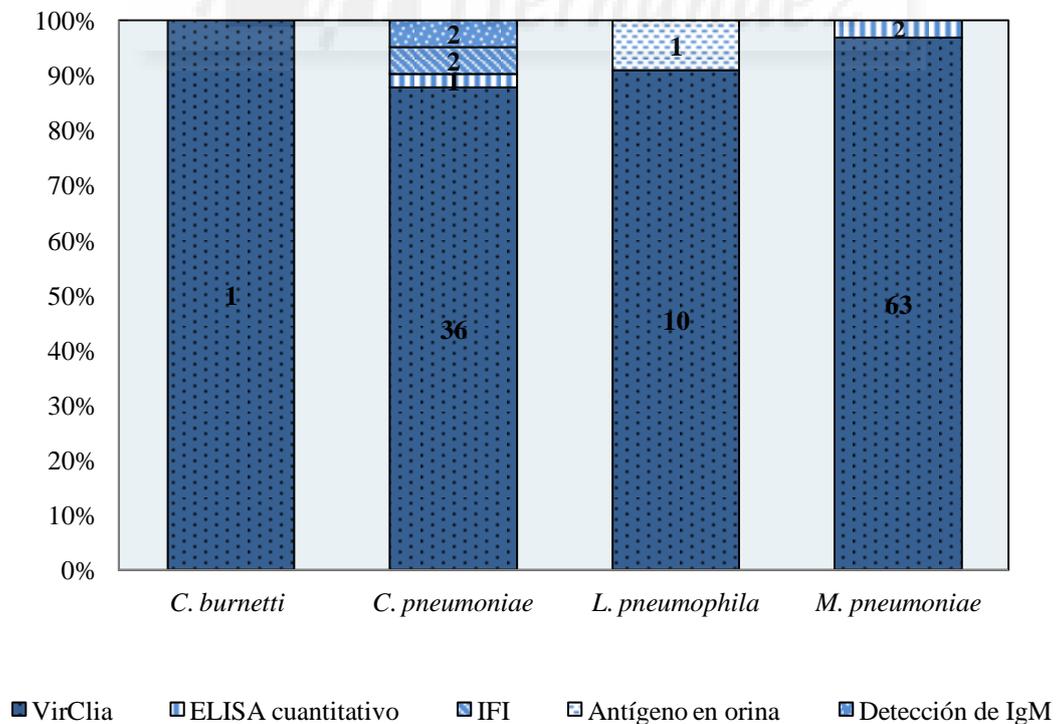
La mayor parte de los patógenos implicados en la NAC de los pacientes estudiados han podido identificarse gracias al empleo de la técnica VirClia, 110 en total, gracias a que se ha podido concluir que índices altos de anticuerpos frente a *C. burnetii* y *L.pneumophila* se pueden considerar criterio de infección aguda y así ha sido utilizado a la hora de determinar un diagnóstico etiológico por estos dos microorganismos. En estos casos todos los pacientes, excepto uno que ha sido diagnosticado gracias a la técnica que permite la detección de antígeno en orina de *L.pneumophila*, han podido ser diagnosticados por VirClia, así como la gran mayoría de los pacientes infectados por *M. pneumoniae* y *C. pneumoniae*.

De los pacientes que han quedado sin diagnóstico establecido por VirClia, hemos podido conseguir un diagnóstico etiológico en tres pacientes más gracias el empleo del ELISA cuantitativo. En concreto se trata de dos infecciones por *M.pneumoniae* y una

por *C.pneumoniae*. La IFI ha identificado dos infecciones agudas por *C. pneumoniae* que no habían sido identificadas por VirClia y también se han requeridos los datos de las IgM para conseguir el diagnóstico por este microorganismo en dos casos más (Figura 2). Además, para la identificación de otros microorganismos causantes de la NAC no considerados atípicos, ha sido necesario el aislamiento en hemocultivo o en esputo de *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *S. agalactie*, y también ha resultado muy útil la detección de antígenos en orina de *S. pneumoniae*.

En total, 41 pacientes han sido diagnosticados con *C. pneumoniae*, y en 19 de ellos se han diagnosticado, además, otros microorganismos lo que indica que se trata de coinfecciones. Además, al analizar la respuesta IgM, se puede saber que en 5 de estos pacientes la infección por *C.pneumoniae* se puede considerar una primoinfección. En concreto, en 2 pacientes no se podría haber diagnosticado la etiología en función de la IgG porque aún no se detectaba la respuesta inmunológica con producción de ellos pero sí de las IgM.

Figura 2. Técnicas requeridas para la identificación de los patógenos atípicos estudiados en los pacientes diagnosticados por éstos.

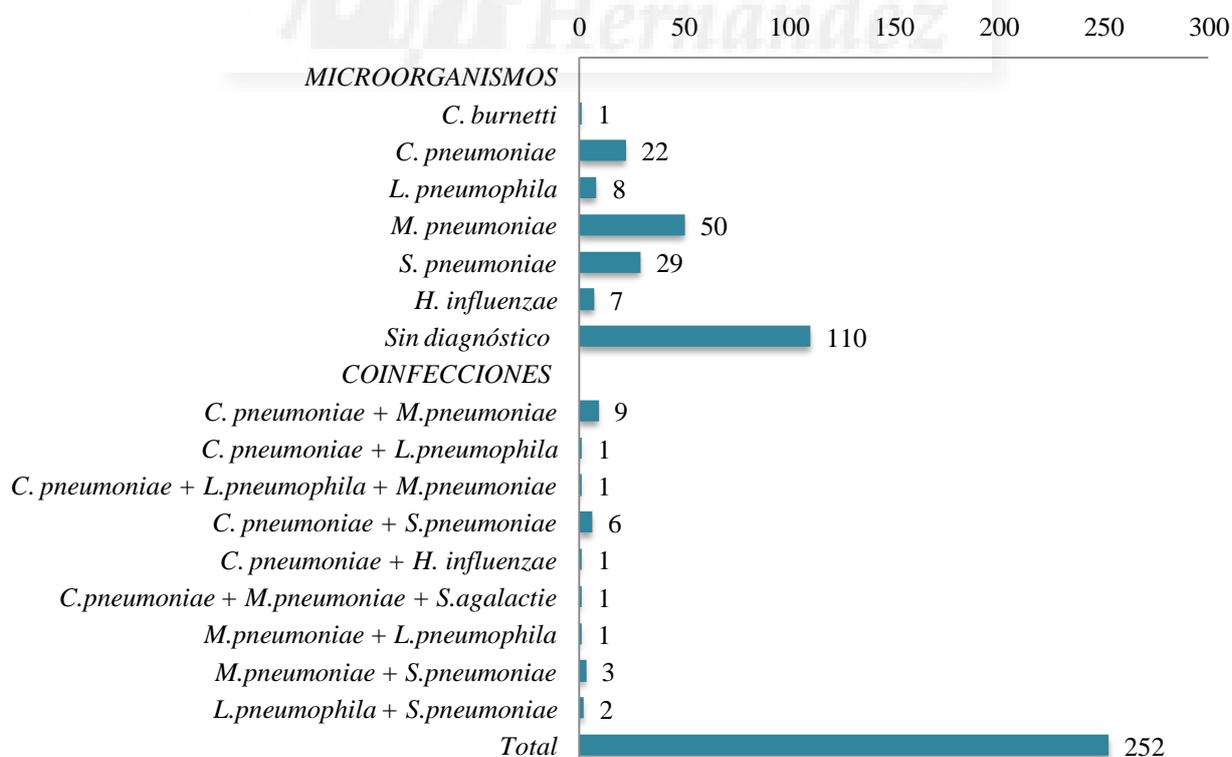


L.pneumophila es el patógeno causante de la NAC en un total de 13 pacientes, y en 5 hay coinfección con otros microorganismos. Uno de ellos ha sido identificado gracias a la técnica de detección de antígeno en orina, y también ha confirmado la infección en otro paciente que sí había sido diagnosticado por VirClia. Además, la detección de IgM ha permitido conocer que se trata de una primoinfección en 4 de estos pacientes.

En el caso de *M. pneumoniae*, 65 pacientes se diagnostican por este microorganismo, tratándose de coinfección junto con otros patógenos en 15 de ellos y confirmando por detección de IgM que se trata de una primoinfección en 17. Estos resultados están descritos gráficamente en la **Figura 3**.

En total 110 de los 252 pacientes del estudio han quedado sin poder establecer un diagnóstico etiológico. En concreto, la falta de muestra correspondiente a la fase aguda ha sido el motivo en 6 pacientes. Sin embargo, muchas de las muestras analizadas con resultados elevados del índice de anticuerpos IgG frente a *C. pneumoniae* y

Figura 3. Diagnóstico etiológico de los pacientes incluidos en el estudio con el empleo de las diversas técnicas serológicas, así como aislamiento en esputo y hemocultivo. En total son unos 252 pacientes diagnosticados etiológicamente, tanto los casos que son infecciones agudas causadas por un solo microorganismo, como las coinfecciones.



M.pneumoniae en los que no se ha podido confirmar la existencia de una seroconversión utilizando los criterios establecidos, han quedado sin diagnosticar o sin confirmar la existencia de coinfección junto con otros microorganismos identificados.

6. DISCUSION

Los estudios que tratan de evaluar la validez de una medida, comparan los resultados de ésta con los obtenidos mediante una prueba de referencia o “gold standard”, que se sabe válida y fiable para la medición del fenómeno de interés. Por otra parte, cuando el objetivo se centra en estudiar la fiabilidad de una medición, se repite el proceso de medida para evaluar la concordancia entre las distintas mediciones. Estos dos planteamientos son los que se han llevado a cabo en el estudio, demostrando que los resultados obtenidos por la técnica VirClia son reproducibles con una buena concordancia entre las dos mediciones realizadas, una en el Servicio de Microbiología del Hospital de San Juan de Alicante y otra en el laboratorio de la empresa Vircell Microbiologists, tanto en la detección de anticuerpos frente a *M. pneumoniae* como en *C. pneumoniae*, habiendo sido analizado estadísticamente con el ICC.

Al comprobar la concordancia entre VirClia y las técnicas de uso en laboratorio clínico que han sido consideradas, se ha visto como en general VirClia es capaz de detectar un mayor número de infecciones aguda que el ELISA cuantitativo, o IFI, por lo que se trata de una herramienta muy útil para el diagnóstico etiológico de pacientes con NAC causada por microorganismos atípicos. Sin embargo, hay un grupo de pacientes que probablemente ya han tenido una respuesta inmunológica en el momento de la extracción de las primeras muestras y muestran índices de anticuerpos elevados que podrían impedir evidenciar el diagnóstico de una infección con los criterios que se consideraron en un principio para VirClia. La evidente equivalencia entre éstos índices altos y los títulos que confirmar la infección por IFI ha permitido establecer otro criterio diagnóstico a tener en cuenta cuando se emplea la técnica VirClia en el laboratorio clínico, aunque únicamente se ha llegado a esta conclusión para dos de los microorganismos estudiados (*C. burnetii* y *L.pneumophila*). Esto que supone una gran ventaja a la hora de establecer el diagnóstico etiológico en un paciente que presente una

infección por uno de estos patógenos, ya que puede realizarse utilizando la técnica VirClia que es más rápida y mucho menos tediosa que la IFI.

Sin embargo, en la NAC producida por *M. pneumoniae* y *C.pneumoniae* no se ha podido establecer ningún tipo de equivalencia ya que, por su elevada prevalencia en nuestro entorno, no podemos diferenciar entre los pacientes con infección aguda avanzada, en los que ya se ha producido la respuesta IgG una vez acuden al hospital y presenta índices elevados de anticuerpos a pesar de no mostrar un aumento que evidencia seroconversión, y los que han podido sufrir una infección pasada que mantiene los niveles de anticuerpos IgG detectables en suero.

En general, el estudio realizado ha permitido diagnosticar a 142 (56.3%) de los 252 pacientes incluidos en la seroteca analizada, gracias principalmente a la técnica VirClia y a las técnicas rápidas de detección de antígenos en orina para la identificación de *S. pneumoniae*. Un total de 25 (9.92%) pacientes presentan coinfecciones por varios microorganismos. Asimismo, la detección de IgM aporta información acerca de las primoinfecciones y en ocasiones puede ayudar a establecer un diagnóstico en el caso de que aún no se haya producido la respuesta de IgG. Sin embargo, ha quedado un 43.7% sin diagnosticar etiológicamente, posiblemente porque el patógeno causal no está incluido entre los que se han estudiado, o porque los datos no han permitido establecer un diagnóstico claro, principalmente en los pacientes comentados con una respuesta inmunológica ya dada en la primera consulta. A pesar de que esto sí se ha conseguido con *L. pneumophila* y *C. burnetii*, queda pendiente establecer un punto de corte en el índice de anticuerpos para tomarlo como criterio que poder emplear en el uso rutinario de la técnica VirClia, aumentando de forma importante su rentabilidad. Sin embargo, no ocurre lo mismo con *C.pneumoniae* o *M. pneumoniae*, ya que es una tarea más complicada la de discriminar entre la infección pasada e infección actual en estado avanzado con una respuesta IgG ya dada, ya que es común detectar títulos positivos de anticuerpos frente a éstos en suero de pacientes adultos. Se ha estimado que en un total de 23 pacientes que han quedado sin diagnosticar y en 16 pacientes diagnosticados con otros patógenos se ha podido dar esta situación.

Por lo tanto, la técnica VirClia ha mostrado una buena reproducibilidad y una concordancia aceptable-buena con otras técnicas serológicas. Podría ser utilizada como técnica de cribado en el diagnóstico etiológico de la NAC por microorganismos atípicos, como *L. pneumophila*, *C. burnetii* o *C.pneumoniae*, aplicando otras técnicas adicionales como la IFI o la detección de anticuerpos IgM para la confirmación de algunos casos. Sin embargo, creemos que son necesarios más estudios para evaluar la utilidad de esta técnica para su uso en el diagnóstico de la infección por *M. pneumoniae* y su correlación con otras técnicas de referencia como la fijación del complemento, puesto que dicha correlación ha resultado ser baja con la microaglutinación.

7. AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al departamento de Enfermedades Infecciosas del Hospital General Universitario de Elche por recoger las muestras que conforman la seroteca y cederla para la realización de este estudio. En especial a Félix Gutiérrez Rodero, jefe de sección del mismo y director del Máster en Enfermedades Infecciosas y Salud Internacional, y a Victoria Ortiz de la Tabla Duccase, jefa de servicio de Microbiología en el Hospital Universitario de San Juan de Alicante, por poner en marcha el proyecto. A Fernando Buñuel Adán, facultativo del Servicio de Microbiología en el Hospital de San Juan de Alicante, por la ayuda prestada. También me gustaría agradecer a la empresa Vircell Microbiologists (Granada) por la cesión de parte de los reactivos que han sido utilizados en el estudio y por la realización de parte de los ensayos en sus laboratorios.

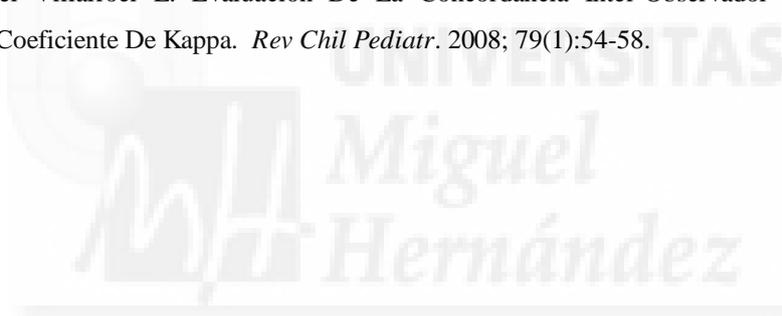
Por último, agradecer a mi familia y amigos, mis grandes incondicionales, la confianza y el apoyo recibido. Por recordarme siempre que todo esfuerzo tiene su recompensa.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Carretero J, Nebreda T, Acereda A, Larumbe Y, Martínez M, Tierno C. Neumonía adquirida en la comunidad remitida al medio hospitalario. *Epidemiología Y Actitud Diagnóstica Y Terapéutica. Arch Bronconeumol.* 1999; 35(1):27-32.
2. 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):543-558.
3. Andrés A, Moreno-Pérez D, Alfayate S, Couceiro J, García M, Korta J et al. Etiología y diagnóstico de la neumonía adquirida en la comunidad y sus formas complicadas. *An Pediatr.* 2012; 76(3):162.e1-162.e18.
4. Chacón A, Ruigómez A, García L. Incidencia de neumonía adquirida en la comunidad en la cohorte poblacional de la base de datos en atención primaria (BIFAP). *Aten Primaria.* 2010; 42(11):543-549.
5. Irizar M, Arrondo M, Insausti M, Mujica J, Etxebarri P, Ganzarain R. Epidemiología de la neumonía adquirida en la comunidad. *Aten Primaria.* 2013; 45(10):503-513.
6. Soriano PL., Murcia J., Laghzaoui F., Beloqui EM., Pastor R., Marquina et al. Estudio epidemiológico de la neumonía adquirida en la comunidad diagnosticada en un servicio de urgencias: ¿influye el índice de Fine en la toma de decisiones? *Emergencias: SEMES,* 2009; 21(4): 247-254.
7. Rodríguez ZR, Hernández PM. Neumonía adquirida en la comunidad: caracterización clínico-epidemiológica. *Rev Med Electrón* 2012; 34(3):281-96. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1684-18242012000300003&script=sci_arttext
8. Sicras-Mainar A, Ibáñez-Nolla J, Cifuentes I, Guijarro P, Navarro-Artieda R, Aguilar L. Retrospective epidemiological study for the characterization of community-acquired pneumonia and pneumococcal pneumonia in adults in a well-defined area of Badalona (Barcelona, Spain). *BMC Infect Dis.* 2012; 12(1):283.
9. Marrie T, Costain N, La Scola B, Patrick W, Forgie S, Xu Z et al. The role of atypical pathogens in community-acquired pneumonia. *Semin Respir Crit Care Med.* 2012; 33(3):244-256.
10. Méndez A, García MJ, Baquero F, Del Castillo F. Neumonía Adquirida en la Comunidad. Protocolos actualizados. *Infectología Pediátrica.* 2008. Madrid: Asociación Española de Pediatría; 2008. p. 57-63.10.
11. Cillóniz C, Ewig S., Polverino E, Marcos MA, Esquinas C, Gabarrús A & Torres A. Microbial aetiology of community-acquired pneumonia and its relation to severity. *Thorax.* 2011; 66(4):340-346.
12. Cunha B. The atypical pneumonias: clinical diagnosis and importance. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12(s3):12-24.
13. Blasi F, Tarsia P, Mantero M. Pneumonia due to *Mycoplasma*, *Chlamydia* and *Legionella*. Ed: Chalmers JD, Pletz MW, Aliberti S, eds. *Eur Respir Monogr.* 2014; 63:13-21

14. Moreno BR, Riquelme OR. Etiología de la neumonía adquirida en la comunidad en el adulto inmunocompetente. *Rev chil infectol.* 2005; 22:18-25
15. Huijskens, EG. *Clinical microbiologist; the gatekeeper of informative diagnostics*, 2014.
16. Fariñas M, Collado C. Infección por *Coxiella burnetti* (fiebre Q). *Enfermedades Infecc Microbiol Clin.* 2010; 28:29-32.
17. Roca B. Fiebre Q. *An Med Interna.* 2007; 24(11): 558-560.
18. García, MJ, Povedano, M, Felices A. Manual de laboratorio de microbiología para el diagnóstico de infecciones respiratorias. Chile: OmniaScience. 2012.
19. Anderson A, Bijlmer HA, Fournier PE, Graves S, Hartzell JD, Kersh G et al. Diagnosis and management of Q fever United States, recommendations from CDC and the Q Fever WorkingGroup. *MMWR Recomm.* 2013; 62(): 1-30.
20. Kantsø B, Svendsen C, Jørgensen C, Krogfelt K. Comparison of two commercially available ELISA antibody test kits for detection of human antibodies against *Coxiella burnetii*. *Scand J Infect Dis.* 2012;44(7):489-494.
21. Illegas E, Sorlozano A, Gutierrez J. Serological diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* infection: limitations and perspectives. *J Med Microbiol.* 2010; 59(11):1267-1274.
22. Bellido-Casado J, Martín-Escudero JC, Tasende-Mata J, Mena-Martín J, Simal-Blanco F, de Lejarazu, RO. *Chlamydia pneumoniae* seroprevalence in adults from the general population. *Med Clin.* 2006; 126(20):765-767.
23. Sadaka S, Gad A, Hanafi N, Metwaly G. Prevalence of *Chlamydia pneumoniae* in patients with pneumonia in the main university hospital in Alexandria. *Egypt. J. Chest Dis. Tuberc.* 2012;61(4):361-370.
24. Eison R. Legionella Pneumonia: When to Suspect, Diagnostic Considerations, and Treatment Strategies for Hospital-Based Clinicians. *Curr Emerg Hosp Med Rep.* 2014; 2(4):205-213.
25. Zabala AMJ, Rodríguez LSM, Font MO, Cuetos Y, Agirresarobe ME, de la Fuente Campos K. Legionelosis esporádica: un problema sin resolver. *Rev de Salud Ambient.* 2013; 13(1), 73-79.
26. Abad I, Velasco M, Marín M, Pérez J, Muñoz M, Jodra E. Brote de legionelosis en un restaurante de la Comunidad de Madrid. *Rev Esp Salud Publica.* 2014; 88(5):661-669.
27. Menéndez MA, Barberán JR, Toral YA. Protocolos de enfermedades infecciosas. Neumonía adquirida en la comunidad. *Sociedad Española de Medicina Interna (SEMI)* 2009:34-49.
28. Gea-Izquierdo E, Mezones-Holguín E, Haro-García L. Acciones de prevención y control de la legionelosis: un reto para la salud pública española. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2012 ;29(2):272-276.
29. Blasi F, Tarsia P, Mantero M. Pneumonia due to *Mycoplasma*, *Chlamydia* and *Legionella*. Ed: Chalmers JD, Pletz MW, Aliberti S, eds. *Eur Respir Monogr.* 2014; 63:67-68
30. Jahandeh N, Saberi F, Fesahat M, Mirnejad R. Different Methods for Diagnosis of *Brucella* and *Legionella spp.* in Various Samples. *J Appl Biotechnol Rep,* 2015; 2(1)187-190.

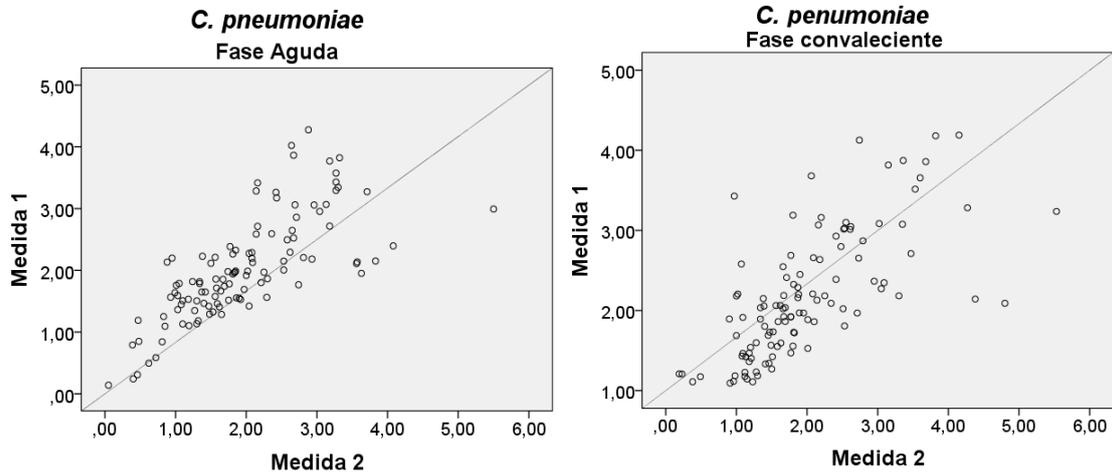
31. Koneman E, Allen S, Janda W, Scheckenberger P, Winn W. Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas color. Ed. Médica Panamericana S.A. 6ta. Edición. 2008: 527-537.
32. Ortigosa S, Ymbert-Pellejá L, Busquets-Monge R, Álvaro-Lozano M, González-Cuevas A, Martínez-Roig A. Estudio clínico y epidemiológico de las neumonías por *Mycoplasma pneumoniae* y adenovirus en un hospital de Barcelona. *Rev Pediatr Aten Primaria*. 2010; 12(46).
33. Meseguer-Peinado M, Acosta-Boga B, Matas-Andreu L, Codina-Grau G. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Mycoplasma*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30(8):500-504.
34. Loens K, Goossens H, Leven M. Acute respiratory infection due to *Mycoplasma pneumoniae*: current status of diagnostic methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010; 29(9):1055-1069.
35. Pérez ML, de Candelaria UNS. Diagnóstico serológico de un brote epidémico de neumonía por *Mycoplasma pneumoniae* en un municipio de Santa Cruz de Tenerife. 2013.
36. Wang C, Wu J, Zong C, Xu J, Ju H. Chemiluminescent Immunoassay and its Applications. *Chinese J Anal Chem*. 2012; 40(1):3-10.
37. Cortés-Reyes E, Rubio-Romero JA, Gaitán-Duarte H. Métodos estadísticos de evaluación de la concordancia y la reproducibilidad de pruebas diagnósticas. *Rev Colomb Obstet Ginecol* 2008; 61(3):247-255.
38. Cerda J, del Villarroel L. Evaluación De La Concordancia Inter-Observador En Investigación Pediátrica: Coeficiente De Kappa. *Rev Chil Pediatr*. 2008; 79(1):54-58.



8. ANEXO

Figura 1. Gráfico de puntos de dispersión de las dos medidas realizadas con la técnica VirClia. Medida 1 en Hospital Universitario de San Juan de Alicante (Alicante), Medida 2 en empresa Vircell S.A. (Granada). La línea de ajuste 1:1 está indicada en los gráficos.

(a) *C. pneumoniae*



(b) *M. pneumoniae*

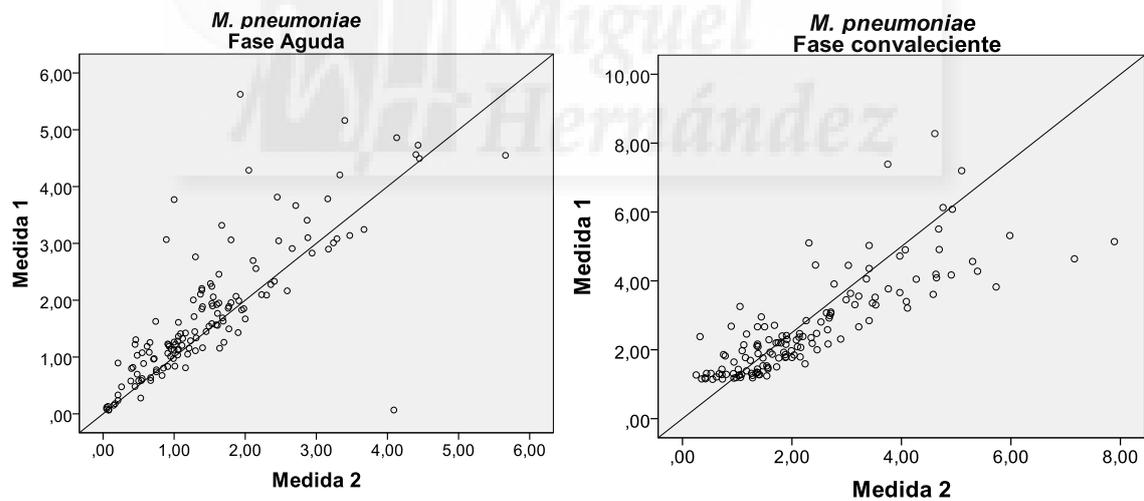


Tabla 1. Características demográficas de la población de estudio.

Variables	n (%)
Sexo	
Hombre	152 (60.3)
Mujer	100 (39.7)
Edad	
Jóvenes (15-24)	43 (17.1)
Adultos (25-59)	154 (61.1)
Adultos (mayores de 60)	55 (21.8)
Comorbilidades	
Sin comorbilidades	245 (97.3)
Diabetes	3 (1.2)
Neoplasia	1 (0.4)
VIH	3 (1.2)
Tratamiento inicial	
Azitromicina oral	172 (66.2)
Levofloxacino iv	16 (6.2)
Levofloxacino oral	63 (24.2)
Augmentine oral	1 (4)
Diagnóstico por métodos convencionales	
Ag neumococo en orina	43 (17.06)
Ag <i>Legionella</i> en orina	4 (1.5)
Aislamiento en Esputo	
No	223 (90.28)
Sí	24 (9.71)
Neumococo	11 (4.45)
<i>Haemophilus</i>	6 (2.43)
<i>S. agalactiae</i>	1 (0.4)
Aislamiento en hemocultivo	
No	246 (98.7)
Sí	3 (1.2)
Neumococo	1 (0.4)
<i>Haemophilus</i>	2 (0.8)

Tabla 2. Estudio de equivalencia entre índices de anticuerpos obtenido mediante la técnica VirClia y títulos de anticuerpos por microaglutinación frente a *M. pneumoniae*.

<i>Mycoplasma pneumoniae</i>								
Títulos bajos			Títulos intermedios			Títulos altos		
Suero	VirClia	Aglutinación	Suero	VirClia	Aglutinación	Suero	VirClia	Aglutinación
128A	1.204	< 1/32	118A	1.856	< 1/64	109 A	4.860	< 1/128
128C	3.608	= 1/32	164 A	2.165	= 1/128	109 C	4.172	< 1/256
131 A	1.496	< 1/32	164 C	2.069	= 1/128	129 A	4.205	= 1/512
131 C	1.242	< 1/32	194 A	1.689	= 1/64	129 C	4.193	= 1/256
134 A	1.287	≥ 1/64	194 C	1.504	= 1/128	130 A	2.899	< 1/256
134 C	1.558	< 1/64	196 A	1.689	< 1/64	130 C	3.453	< 1/128
173A	1.447	< 1/64	196 C	1.504	< 1/64	140A*	1.124	< 1/64
181 A	1.541	≥ 1/64	203A	2.090	< 1/64	140C	5.316	< 1/64
181 C	1.871	= 1/64	234A	1.851	< 1/64	149A	3.245	< 1/128
248 A	1.155	≥ 1/64	235A*	0.839	< 1/32	197A*	1.768	< 1/32
248 C	1.256	= 1/64	235C	2.582	< 1/64	197C	4.281	= 1/64
308A	0.332	≥ 1/64	243A	1.671	≥ 1/64	226 A	3.082	< 1/256
308C	1.338	≥ 1/128	243C	2.187	≥ 1/128	226 C	3.356	< 1/64
			250C	1.849	< 1/64	233A*	0.637	= 1/32
			272C	2.200	< 1/64	233C	2.992	< 1/64
			275A*	0.805	< 1/32	238A	4.550	= 1/256
			275C	1.776	< 1/64	241A	4.490	< 1/128
			290A	2.557	= 1/128	397A	3.666	< 1/128
			362A*	0.973	≥ 1/64	508A	2.910	< 1/64
			362C	2.311	≥ 1/128	508C	8.276	≥ 1/512
			536 A	2.292	< 1/64	615 A	3.771	< 1/256
			536 C	2.413	= 1/64	615 C	1.772	< 1/256
			624 A	2.763	< 1/64	622A	4.287	< 1/128
			624 C	1.484	< 1/64	622C	3.096	< 1/128
			657A*	1.448	< 1/128	623 A	5.624	= 1/512
			657C	1.795	< 1/128	623 C	2.470	≥ 1/1024
						645 A	3.009	≥ 1/256

*Muestras cuyos índices de anticuerpos detectados por VirClia no corresponden a la columna en la que se encuentran, sino que se han colocado las muestras pareadas juntas.

Tabla 3. Estudio de equivalencia entre índices de anticuerpos obtenido mediante la técnica VirClia y títulos de anticuerpos por IFI frente a *C. burnetii*. Las diluciones realizadas fueron 1/64 y 1/128 porque títulos superiores a éste se considera evidencia de infección aguda.

<i>Coxiella burnetii</i>		
Suero	VirClia	IFI
599A	1.834	≥ 1/128
599C	1.537	≥ 1/128

Tabla 4. Estudio de equivalencia entre índices de anticuerpos obtenido mediante la técnica VirClia y títulos de anticuerpos por IFI frente a *L. pneumophila*.

<i>Legionella pneumophila</i> serogrupo I					
Títulos bajos			Títulos altos		
Suero	VirClia	IFI	Suero	VirClia	IFI
186 A	1.128	≥ 1/128	149 A	2.808	≥ 1/256
186 C	1.200	≥ 1/128	149 C	2.108	≥ 1/256
400 A	1.689	≥ 1/128	165 A	3.004	≥ 1/128
400 C	1.499	≥ 1/128	165 C	2.987	≥ 1/128
903 A	1.683	≥ 1/128	167 A	5.618	≥ 1/256
903 C	1.556	≥ 1/64	167 C	4.678	≥ 1/256
			226A*	0.255	≥ 1/128
			226C	6.110	≥ 1/256
			394A	2.152	= 1/128
			555A*	0.832	≥ 1/64
			555C	2.950	≥ 1/256
			904 A	6.004	< 1/64
			904 C	5.701	= 1/128

*Muestras cuyos índices de anticuerpos detectados por VirClia no corresponden a la columna en la que se encuentran, sino que se han colocado las muestras pareadas juntas.

Tabla 5. Estudio de equivalencia entre índices de anticuerpos obtenido mediante la técnica VirClia y títulos de anticuerpos por IFI frente a *C. pneumoniae*.

<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>								
Títulos bajos			Títulos intermedios			Títulos altos		
Suero	VirClia	IFI	Suero	VirClia	IFI	Suero	VirClia	IFI
109 A	1.577	= 1/32	149 A*	1.235	= 1/128	118 A	3.295	≥ 1/256
109 C	1.566	= 1/64	149 C	2.550	< 1/128	118 C	3.272	< 1/512
141 A	1.758	= 1/32	164A*	0.139	< 1/64	128A	3.770	≥ 1/256
141 C	1.332	= 1/32	164C	1.894	≥ 1/256	147A	3.263	≥ 1/256
196 A	1.103	= 1/64	177 A	1.988	= 1/256	151 A	3.286	= 1/128
196 C	1.185	≥ 1/64	177 C	1.863	= 1/256	151 C	2.929	< 1/512
239A	0.842	≥ 1/64	180A	2.587	= 1/128	167C	3.238	≥ 1/256
239C	1.115	≥ 1/128	197A	1.972	< 1/128	234A*	2.126	= 1/128
252 A	1.549	= 1/64	203 A	2.396	= 1/256	234C	3.190	= 1/128
252C	1.728	= 1/64	203 C	2.183	= 1/256	243 A	3.058	= 1/512
285A	1.713	< 1/128	223 A	2.326	< 1/128	243 C	3.086	< 1/512
560A	0.241	< 1/32	223 C	1.968	< 1/128	250A	3.067	≥ 1/256
560C	1.341	< 1/64	226C	2.064	< 1/128	397 A	4.275	=1/128
			247C	2.450	≥ 1/256	397 C	3.048	< 1/512
			248A	1.864	= 1/64	452A	3.575	≥ 1/128
			248C	2.547	= 1/64	452C	4.190	= 1/256
			249 A	2.211	= 1/128	456A	3.173	≥ 1/256
			249 C	2.289	= 1/256	456C	3.100	< 1/256
			260C	2.183	≥ 1/256	490A*	2.524	< 1/128
			264C	2.389	= 1/64	490C	3.028	≥ 1/512
			271A	1.858	< 1/64	591A	2.993	≥ 1/256
			271C	2.688	< 1/128	658C	3.516	< 1/128
			276C	1.914	< 1/128			
			288C	2.207	< 1/128			
			290A	2.110	≥ 1/256			
			308C	2.654	= 1/64			
			310C	1.860	= 1/64			
			320C	2.412	= 1/128			
			362 A*	4.022	≥ 1/256			
			362C	1.807	≥ 1/256			
			382A	2.264	=1/64			
			398A	1.943	< 1/128			

401C	2.798	< 1/128
559A	2.195	< 1/128
601A	2.135	≥ 1/64
601C	2.366	< 1/128
622A	2.149	< 1/128
622C	2.347	< 1/128
628A	1.421	≥ 1/64
628C	1.968	= 1/64
657A	2.716	< 1/128
657C	2.143	< 1/128

*Muestras cuyos índices de anticuerpos detectados por VirClia no corresponden a la columna en la que se encuentran, sino que se han colocado las muestras pareadas.

Tabla 8. Infección aguda identificada por cumplimiento de los criterios que se han establecido según cada técnica y microorganismo.

Microorganismos	Cumplimiento de criterios de infección aguda según cada técnica			
	VirClia	IFI	Microaglutinación	ELISA cuantitativo
<i>C. burnetii</i> (n=1)	1	1	-	-
<i>C. pneumoniae</i> (n=113)	36	4*	-	6
<i>L. pneumophila</i> (n=10)	10	10	-	2
<i>M. pneumoniae</i> (n=138)	63	-	1*	41

*En estos casos sólo se estudian los pacientes cuyas muestras pareadas han sido seleccionadas a la hora de establecer la equivalencia entre índices de VirClia y títulos en la técnica de referencia: IFI en la detección de anticuerpos frente a *C. pneumoniae* (n=24) y microaglutinación frente a *M. pneumoniae* (n=27).

Tabla 10. Comparación de las técnicas utilizadas en *C.pneumoniae*. (a) Tabla de contingencia al evaluar concordancia entre VirClia e IFI (b) Tabla de contingencia al evaluar concordancia entre VirClia e ELISA cuantitativo.

(a)

Infección aguda detectada por seroconversión (n=34)		Según IFI		κ	p-valor de κ
		Ausente	Presente		
Según VirClia	Ausente	24 (70,6%)	1 (2,9%)	0.357	0.019
	Presente	6 (17,6%)	3 (8,8%)		

(b)

Infección aguda detectada por seroconversión (n=112)		Según ELISA cuantitativo		κ	p-valor de κ
		Ausente	Presente		
Según VirClia	Ausente	75 (67,0%)	2 (1,8%)	0.114	0.054
	Presente	31 (27,7%)	4 (3,6%)		

Tabla 11. Comparación de las técnicas utilizadas en *Mycoplasma pneumoniae*. (a) Tabla de contingencia al evaluar concordancia entre VirClia y microaglutinación (b) Tabla de contingencia al evaluar concordancia entre VirClia e ELISA cuantitativo.

(a)

Infección aguda detectada por seroconversión (n=26)		Según Microaglutinación		κ	p-valor de κ
		Ausente	Presente		
Según VirClia	Ausente	15 (57,7%)	0 (0%)	0.103	0.234
	Presente	10 (38,5%)	1 (3,8%)		

(b)

Infección aguda detectada por seroconversión (n=138)		Según ELISA cuantitativo		κ	p-valor de κ
		Ausente	Presente		
Según VirClia	Ausente	73 (52,9%)	2 (1,4%)	0.609	<0.05
	Presente	24 (17,4%)	39 (28,3%)		