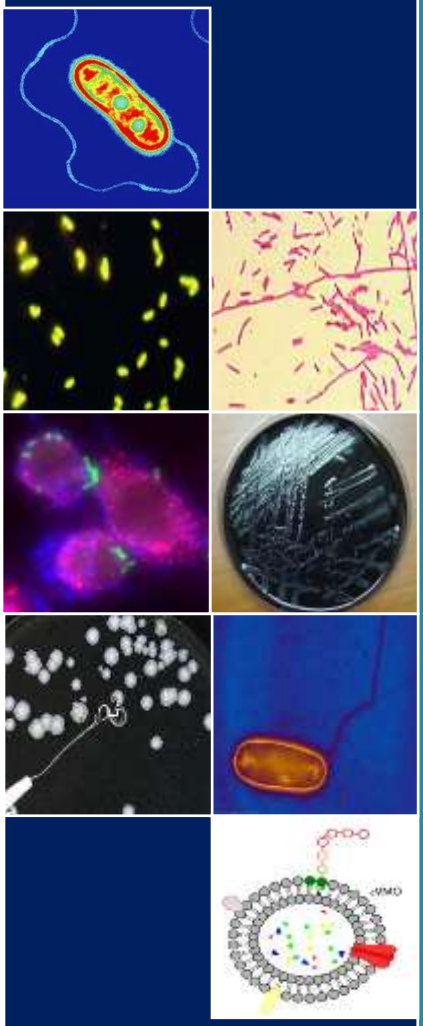
Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Tesis para la obtención del título de Químico Farmacéutico Biólogo



Manual de Diagnóstico Microbiológico

Legionella pneumophila

Por:

José Eduardo Toledano Tableros

Área:
Microbiología Médica

Director: M en C Roberto Cruz González Meléndez

Opción de titulación: Apoyo a la docencia

Con apoyo del Proyecto PAPIME PE 209012

Septiembre de 2013

AGRADECIMIENTOS

Para quienes han sabido guiar mis pasos hacia el conocimiento y ha sembrado en mí la vocación de servir para la ciencia y tratar de ser cada día mejor en todos los aspectos, con estas palabras agradezco a los profesores que me impartieron clases durante estos cinco años de formación académica.

A si mismo agradezco a mi director de tesis por darme la oportunidad de titularme con uno de sus proyectos, y por el apoyo brindado durante la realización del mismo, así como a mi tutora asignada en la facultad por su apoyo incondicional desde el inicio de mi formación profesional en esta institución universitaria.

DEDICATORIA

Quiero agradecer a Dios por tenerlos a ustedes, mi madre y a mi padre, los cuales no pudieron haberme tocado mejores, y a quienes dedico este trabajo, es a ustedes quienes con su confianza, cariño y apoyo sin escatimar esfuerzo alguno, me han convertido en un hombre de provecho, ayudándome en el logro más importante que es: mi carrera profesional. Por compartir tristezas, alegrías, éxitos y fracasos por todos los detalles que me han brindado durante mi vida como estudiante y por hacer de mí lo que soy ahora. Hoy se ven culminados todos nuestros esfuerzos, iniciándose una etapa más de mi vida, en la que siempre estarán en mi corazón. Por esto y mucho más mi profundo agradecimiento.

También dedico este trabajo a mi hermana así como al resto de mi familia y mis amigos por su apoyo moral para la culminación de estos años de esfuerzo.

ÍNDICE

Introducción…… 1

Marco Teórico…… 2

Problema de Investigación…… 18

Objetivos…… 19

Diseño de Investigación…… 20

Resultados…… 22

Discusión…… 113

Conclusiones…… 115

Propuestas…… 116

Referencias bibliográficas…… 117

Introducción

Entre las múltiples actividades de un QFB está la de realizar análisis microbiológicos para búsqueda e identificación de bacterias y otros microrganismos como hongos, virus, que están causando daños a la integridad física de un paciente, depende de nosotros hacer que ese paciente mejore a través de la emisión de un diagnóstico acertado de lo que le está afectando y que el médico pueda administrar el tratamiento adecuado para su mejoría y dicha enfermedad infecciosa sea erradicada eficazmente. Es por ello que al elaborar un manual integral de diagnóstico microbiológico se está reforzando la formación académica en el área de la microbiología médica, parte importante del desempeño profesional del QFB de la FES Zaragoza.

En este caso *Legionella pneumophila* que es la bacteria en estudio, es una causa importante de neumonías graves, adquiridas tanto en la comunidad como en el medio hospitalario que se presenta esporádicamente o bien en forma de brotes, aunque no es común en México es común en países como España o en los Estado Unidos, siendo países con los que México tiene una alta relación social, comercial, turística principalmente, es por ello que aunque no sea común en nuestro país hay mucha información de esta bacteria debido a este tipo de relaciones en las que el intercambio humano es muy amplio pudiendo traer esta infección a nuestro país en gran cantidad, o viceversa ya que esta bacteria es ubicua.

Debido a que hay una buena cantidad de información, se ha tratado de compactar en este manual que es el primero en su tipo sobre esta bacteria, integrando todos los aspectos necesarios para su identificación, desde la parte anatómica humana, hasta la parte molecular de la bacteria, requiriendo de muchos de los conocimientos de diferentes materias cursadas durante la carrera, no fue fácil la integración de esta información, sin embargo al final se logró organizar, darle secuencia y lógica a la redacción para hacerlo fácil de entender a los estudiantes, ya que en el ámbito laboral, es decir en un hospital los médicos requieren de nuestra ayuda no solo para las pruebas de laboratorio, sino para tomar la muestra adecuada, o para darle una orientación sobre el diagnóstico, por lo que toda esta información la debemos manejar para poder apoyar al médico ya que al final es para la mejoría y recuperación de la salud de un paciente, es decir de una vida.

El diagnóstico los médicos lo hacen en base a la sintomatología y su experiencia, que también se incluyen, pero el diagnóstico confirmatorio depende del laboratorio siendo el aislamiento del microrganismo en medios especiales el llamado “estándar de oro” así como de diversas técnicas directas e indirectas, para conformar este manual de diagnóstico microbiológico.

Marco Teórico

"La serie de muertes provocadas por un brote epidémico de una enfermedad respiratoria misteriosa en Filadelfia, se incrementó de 2 a 25, por lo que los investigadores médicos aceleraron los esfuerzos para buscar una sustancia química o un veneno como posible causa de la enfermedad", esto publicaba el diario The New York Times, el 7 de agosto de 1976, sin sospechar aun que la causa de esta epidemia era un nuevo género de bacterias, y no sería hasta principios de Enero de 1977 cuando el doctor Joseph McDade de la Center for Desease Control (CDC) aisló el agente etiológico de este trastorno, resolviendo así el enigma y dio pie así a la creación de esta nueva familia de bacterias, la *Legionellaceae*. En los siguientes párrafos se expone de manera resumida la caracterización de este género, así como su identificación fisiopatológica y de laboratorio hasta su tratamiento.[1]

Taxonomía

Legionella es un género que adquiere su nombre del brote epidémico que surgió en la convención de Legionarios Estadounidenses, la designación de la especie que es la principal patógena para seres humanos: *Legionella pneumophila*, refleja su propensión a causar neumonía, hoy se sabe que este género es un saprófito acuático ubicuo es decir tiene una gran distribución en el ambiente. [1]

Dentro de la Familia *Legionellaceae*, gracias a los análisis de ADN se dividió en 3 géneros: *Legionella, Tatlockia, y Fluoribacter*, el género *Legionella*, es el más importante y el único que se encuentra en seres humanos, se han encontrado 45 especies de las cuales 20 sólo se han reportado aisladas de seres humanos, *Legionella pneumophila* comprende aproximadamente 16 serotipos, *Legionella pneumophila* de serogrupo 1 es la causante de la epidemia de 1976. Estos saprófitos acuáticos que en ocasiones causan enfermedad clínica tienen como principales reservorios las amebas de aguas dulces, acondicionadores de aire, y dispositivos de plomo con agua potable. [14, 15]

Caracterización

Son bacilos aeróbicos trofoselectivos es decir nutricionalmente exigentes y que no son cultivables en medios convencionales, son pleomórficos al presentar una forma elongada o filamentosa de 0.3 a 1 µm de ancho por 1.5 hasta 100 µm de longitud, a pesar de tener una pared celular gramnegativa típica no es visible con tinción de Gram, ya que la safranina la tiñe muy levemente, siendo necesario en caso de no usar otro método, utilizar fucsina básica como colorante de contraste tal y como se observa en la **Figura 1**,

por lo que es necesario recurrir a otras técnicas como la tinción de Giménez que es más eficaz y rápida que la de Gram, o de impregnación argéntica (de plata) como la de Dieterle. [1, 18]

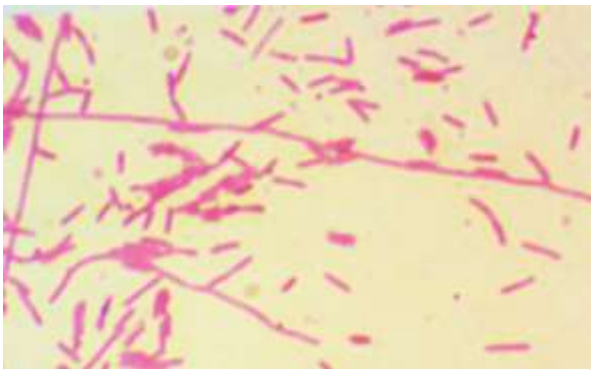


Figura 1.– *Legionella pneumophila* con tinción de Gram utilizando fucsina básica como colorante de contraste: estos microrganismos captan débilmente la fucsina y casi nada la safranina[8]

Son carentes de capsula, no esporulados, dotados de flagelos polares, subpolares y laterales , otra característica interesante es la existencia en su pared de una elevada proporción de ácidos grasos de cadena ramificada y no ramificada, lo que proporciona a estos microorganismos un perfil cromatográfico de ácidos grasos especifico, rasgo útil para su identificación. [18, 20]

No oxidan ni fermentan azúcares y utilizan aminoácidos como fuente primaria de energía, pese a su diversidad todas las especies de *Legionella* tienen requerimientos nutricionales absolutos de L-cisteína en el aislamiento primario y todas, a excepción de una especie *(L. oakridgensis*), requieren de la presencia de L- cisteína en los medios de cultivo para su óptimo desarrollo en las siguientes fases de su identificación. Las reacciones de oxidasa y de catalasa son variables, la mayoría de las especies crecen mejor en medios con aire humidificado y otras con un 2-5 % de CO_2, su pH óptimo es de 6.8 a 6.9.[15]

Aunque sólo se han definido unas pocas características bioquímicas y de su cultivo, éstas son suficientes para distinguir a *Legionella pneumophila* de otras bacterias. Es un aerobio obligado que requiere de L- Cisteína con HCl para crecer en medios de laboratorio, aunque crece de 25 a 42 °C su temperatura óptima es de 35 °C en aire con o sin el CO_2 del 2 a 5%, es catalasa positivo, oxidasa débil, gelatinasa y β-lactamasa positivo, contiene flagelos polares y laterales así como apéndices de tipo flagelar.[21]

Importancia clínica

Es causante de la enfermedad de los Legionarios que es una forma clínica de una enfermedad más general llamada "legionelosis", ésta difiere de la segunda forma la fiebre de Pontiac en su frecuencia de ataque, incubación y severidad. Es una enfermedad multisistémica que afecta principalmente el sistema pulmonar pero que también puede afectar el sistema digestivo, los riñones y hasta el SNC. La supervivencia de los pacientes depende de una rápida y buena terapia.[20]

Estructura Antigénica

Los organismos del género *Legionella* poseen dos clases principales de antígenos. En la superficie celular existe un antígeno soluble, termolábil, identificado como un complejo de elevado peso molecular constituido por una asociación lípido- proteína- hidrato de carbono, en la que la fracción antigénica parece residir en la fracción polisacárida y la responsable de su especificidad de serogrupo. Este complejo por su estructura química y su actividad biológica resulta similar más no idéntico a las clásicas endotoxinas de las bacterias gramnegativas.[20]

Patogenicidad y Virulencia

Hasta el momento sólo ha sido demostrado de forma inequívoca un determinante de patogenicidad, se trata de una proteína de superficie de 24 kDa denominada MIP (potenciador de la infectividad del macrófago) que es requerido para una óptima infección intracelular y para la total expresión de la virulencia, además se ha demostrado que dicha proteína inhibe la actividad de la proteína quinasa C. [20, 24]

Si bien no se conoce el mecanismo exacto por el cual *Legionella pneumophila* logra causar enfermedad, su capacidad de evitar la destrucción por las células fagocitadas del huésped desempeña un papel significativo en el proceso infeccioso, además de otros factores fundamentales para la infección intracelular como las que se mencionan a continuación: [25]

- Proteína de choque térmico 60
- Potenciador de infección a macrófagos (Mip)
- Proteínas de membrana externa (MOMP)
- Flagelos
- Sistema de secreción de tipo IV Dot/icm
- Genes que codifican el sistema de secreción de tipo II requerido para el crecimiento intracelular.

Estudios recientes también han revelado la existencia de vesículas que se liberan de la membrana externa que poseen muchos de los factores de virulencia como el Mip, o el MOMP, capaces de estimular una respuesta inmune e infectar a más macrófagos, en la **Figura 2** se pueden observar estas vesículas así como la composición de la pared bacteriana.[23]

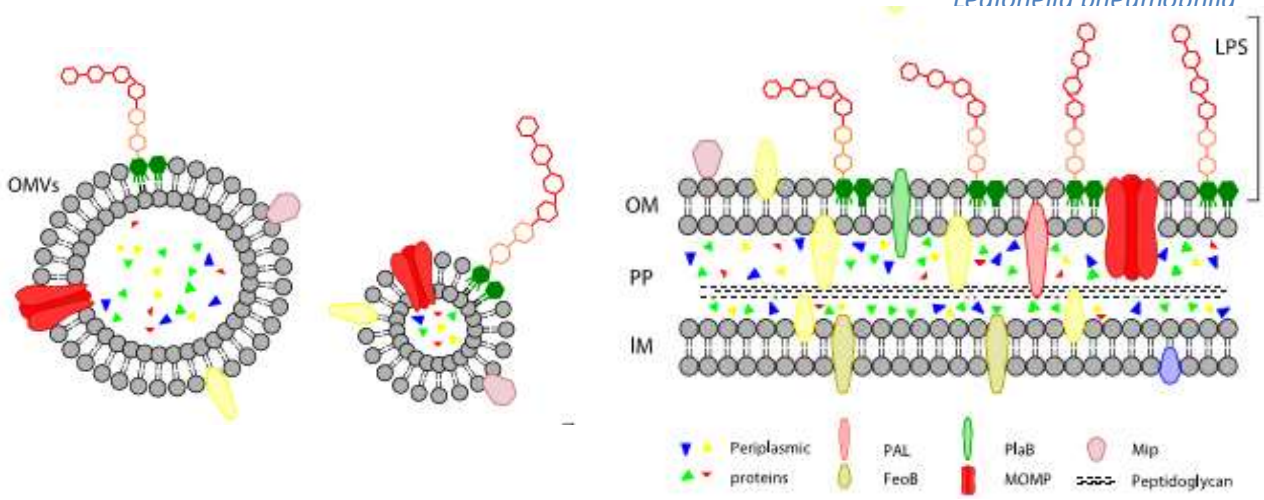


Figura 2.-Vista de la pared celular de *Legionella pneumophila*: CP: citoplasma; LPS: Lipopolisacáridos: OM: membrana externa; PP: periplasma; IM: Membrana interna; OMV´s: Vesículas de membrana externa; PAL: Peptidoglicano asociado a lipoproteína; FeoB: transportador de Hierro; MOMP: Proteína mayor de la membrana externa; Mip: Potenciador de infectividad a macrófagos[23]

La intervención a los macrófagos puede ser mediada por la intervención del complemento fijado sobre la superficie celular, aunque también puede ocurrir sin su intervención. En el interior de las células reside en un fagosoma especializado que no se fusiona con los lisosomas y por lo tanto el fagosoma no llega a ser acidificado y además la actividad respiratoria es minimizada. En el interior del fagosoma continua su multiplicación bacteriana hasta que el macrófago es destruido y liberada la progenie bacteriana, este ciclo puede repetirse en los alveolos lo que conduce a una amplificación de la infección. En la **Figura 3** se hace una comparación entre el proceso normal de la fagocitosis y lo que sucede cuando es invadida por *Legionella.*[16, 24]

Las células diana, como consecuencia de su estimulación por las legionellas, liberan citocinas capaces de atraer a otras células inflamatorias hacia los focos de infección. El daño de los tejidos puede ser atribuido a los productos bacterianos tóxicos (legiolisina, proteasas, DNAsas, endotoxina) o bien a sustancias liberadas por los propios leucocitos. En la mayoría de los casos se produce una bronconeumonía confluente que progresa hacia una neumonía lobular. La infección puede difundir habiéndose demostrado focos de infección en riñones, bazo, médula ósea, hígado.

Legionella pneumophila tiene 2 fases en su ciclo de vida:

1.- Fase replicativa intracelular (FR)
2.- Fase transmisiva no replicativa infecciosa (TP), o forma quística.

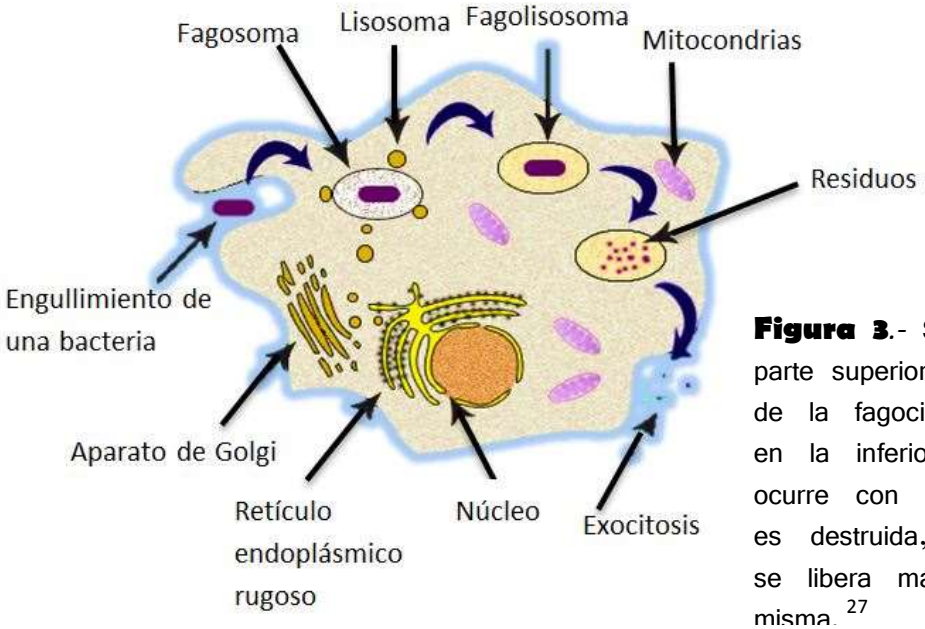
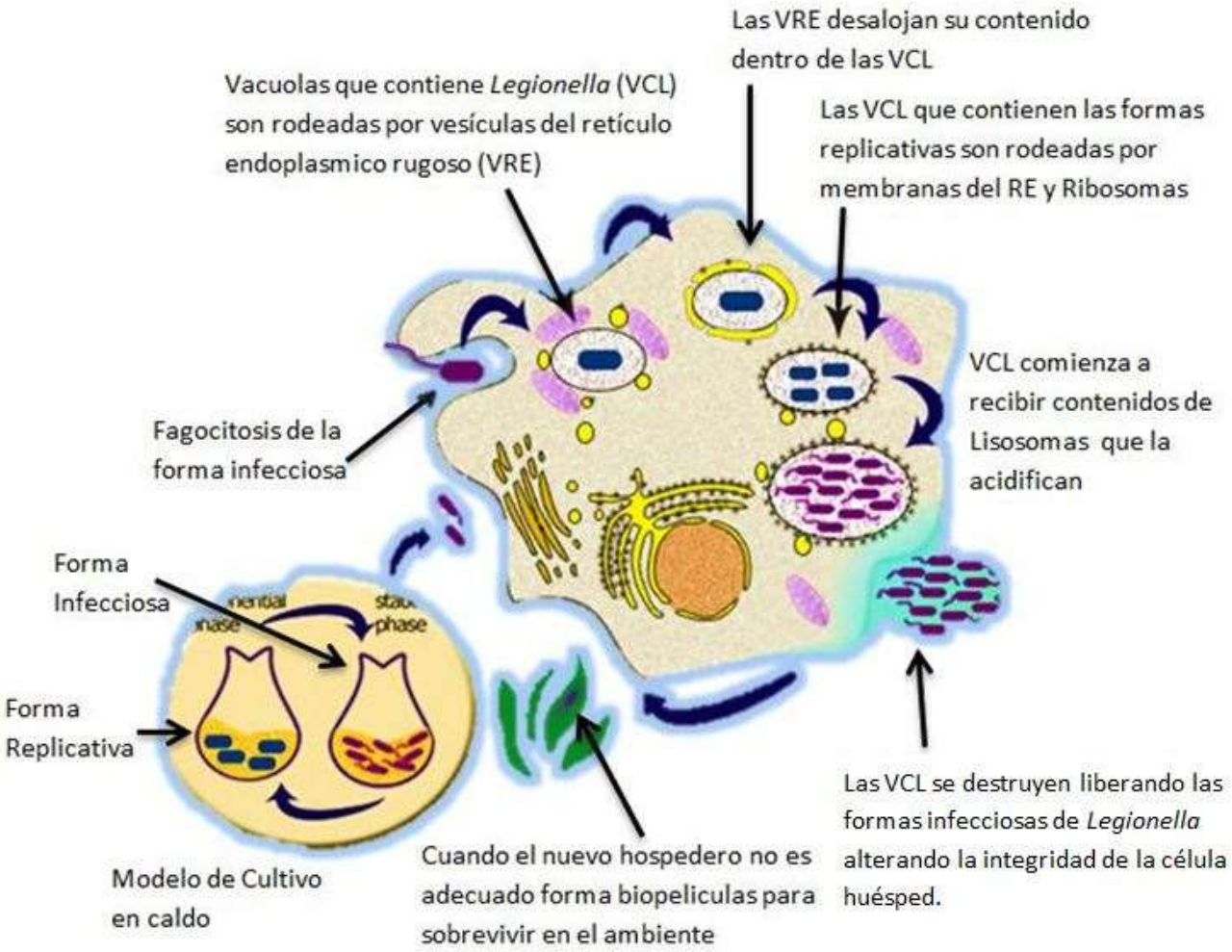


Figura 3.- Se observa en la parte superior el proceso normal de la fagocitosis mientras que en la inferior el proceso que ocurre con *Legionella* que no es destruida, por el contrario se libera más progenie de la misma.[27]



En la FR son avirulentas, no flageladas, y resistentes a detergentes. Mientras que en la TP son virulentas, flageladas, y móviles. Un sistema complejo regulatorio es el que rige la diferenciación entre estas dos fases. En la TP la bacteria tiene una expresión genética concerniente con la transmisión y el ataque a las células del hospedero, mientras que en la RP sólo expresa componentes de metabolismo aeróbico, por lo que este sistema regulatorio no sólo controla la virulencia si no también la motilidad. La fase replicativa comienza con la unión del complemento a una proteína que es la porina de la membrana externa y C3b en la superficie bacteriana. Esto permite que las bacterias se unan a los receptores C3R del complemento de los fagocitos mononucleares. [16, 24]

Legionella pneumophila es un patógeno que causa infecciones en el tracto respiratorio, principalmente en sujetos vulnerables que inhalan en forma de aerosol partículas infecciosas, en núcleos de gotitas de menos de 5 µm, son parásitos intracelulares facultativos de los fagocitos mononucleares principalmente de los monocitos y macrófagos alveolares, su capacidad patógena está íntimamente relacionada con la facultad de sobrevivir y multiplicarse dentro de los fagocitos. El organismo es penetrado por inhalación hasta los pulmones donde va a afectar principalmente a alveolos y bronquiolos terminales, en dichos territorios es fagocitado por las células del huésped. [16, 20, 24]

Las especies de *Legionella* pueden infectar y multiplicarse dentro de algunas especies de amebas de vida libre (especies de *Acanthamoeba sp* y *Naegleria sp*) o dentro de biopelículas o biofilms, son microcolonias de bacterias bien organizadas por lo común encerradas en matrices de polímeros que están separadas por canales de agua que eliminan desechos y proporcionan sus nutrientes. Esta propiedad de las legionelas contribuye a la supervivencia en el ambiente, es decir puede sobrevivir en su hábitat en condiciones desfavorables, como con temperaturas de 0 °C a 63 °C, pH de 5 a 8.5, y puede sobrevivir en muestras de agua entre 2 °C y 8 °C por años. [5, 25]

Estas bacterias también son tolerantes al Cloro, sobreviven en aguas tratadas y pasan a los sistemas de distribución y refrigeración, donde proliferan. Esto ocurre gracias a sus propiedades antes descritas: formación de biopelículas, así como de la fase quística o fase no replicativa. [5]

Manifestaciones clínicas

Desde el punto de vista clínico, la neumonía está presente en todos los casos de enfermedad de los legionarios sugiriendo que el sitio de entrada primario de la bacteria sea el mismo tracto respiratorio. La incidencia depende del grado de contaminación del

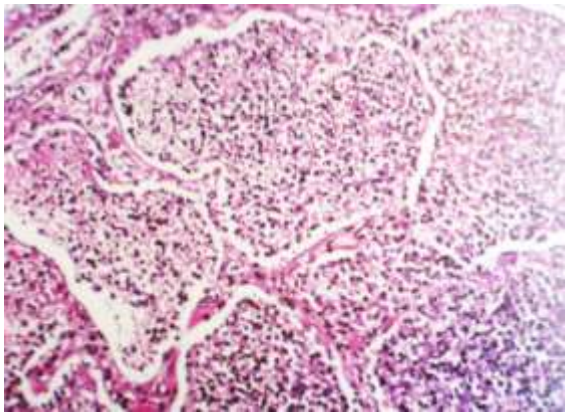


Figura 4.- *Legionella pneumophila* en alveolos, obsérvese que algunos están llenos de exudado y otros han iniciado su degeneración. [6]

reservorio acuático, de la susceptibilidad de las personas expuestas a esta agua y también de la intensidad de la exposición. El principal modo de contaminación es la aerolización, asi como de la aspiración y casos de ingestión de agua contaminada. [5]

Legionella pneumophila es notable por su propensión para atacar el pulmón, dando origen a una neumonía necrosante de focos múltiples, desde el punto de vista microscópico el proceso afecta los alvéolos y bronquiolos terminales, como se observa en un corte histológico de la **Figura 4**, respetando relativamente los bronquiolos de mayor calibre y los bronquios. El exudado inflamatorio contiene fibrina, neutrófilos polimorfonucleares, macrófagos y eritrocitos. [1]

Las infecciones asintomáticas por *Legionella* son relativamente frecuentes, las infecciones sintomáticas afectan principalmente a los pulmones. El mecanismo por el cual *Legionella* puede ser transmitida por ingestión es la subsecuente bacteriemia que ocurre después de su penetración en el tracto digestivo, la diarrea es un síntoma muy frecuente en la enfermedad de los Legionarios, se considera a la aspiración de agua contaminada un importante modo de transmisión intrahospitalaria sobre todo en pacientes sometidos a cirugía de cabeza y cuello. [5]

El espectro de las infecciones por *Legionella* comprende 3 grandes tipos:

1. Enfermedad de los Legionarios
2. Fiebre de Pontiac
3. Infecciones Extrapulmonares

Las primeras 2 son las más importantes y se resumen en el **Cuadro 1.**

Infecciones extrapulmonares: Estas infecciones suelen ser raras pero usualmente ocurren septicemias es decir una diseminación de la bacteria durante el curso de la neumonía, y se ha reportado en pacientes inmunocomprometidos o en pacientes con un cuadro de enfermedad de los legionarios muy grave, sin embargo, en otras ocasiones no guardan ninguna relación con dicha afección, entre ellas cabe señalar, pielonefritis, pericarditis, miocarditis con prótesis valvulares, peritonitis, infecciones de las heridas, abscesos cutáneos, cerebrales y perirenales. En otros casos la diseminación ocurre en pacientes

que no padecen la enfermedad de los legionarios, sino que son inoculados directamente con la bacteria como la ingesta de agua contaminada. [14, 20]

	Enfermedad de los Legionarios	Fiebre de Pontiac
Mortalidad (%)	15-30	0
Periodo de incubación	2-10 días	1-2 días
Tasa de ataque	<5%	>95%
Factores de riesgo	Múltiples	ninguno
Curso	Progresivo	Limitado
Síntomas	Fiebre, escalofríos, tos, mialgias, cefalea, dolor torácico, expectoración y diarrea (y en algunos casos confusión y alteraciones del estado psíquico)	Similares a los de la gripe: fiebre, escalofríos y mialgias (en algunos casos tos, dolor torácico y confusión.)
Pulmones	Neumonía y derrame pleural (en algunos casos absceso de pulmón)	Dolor pleural: ausencia de neumonía; ausencia de absceso pulmonar
Riñones	Insuficiencia renal (en algunos casos proteinuria, azoemia y hematuria)	Ausencia de manifestaciones renales
Hígado	Alteraciones moderadas de la función hepática	Sin particularidades de las pruebas funcionales hepáticas
Tracto GI	Diarrea líquida, dolor abdominal, náuseas y vómitos.	Sin particularidades
SNC	Somnolencia, delirios, desorientación, confusión y obnubilación (en raros casos se observaron convulsiones)	Ausencia de manifestaciones del sistema nervioso central.
Momento de inicio	Enfermedad epidémica a finales del verano o en otoño; enfermedad endémica durante todo el año	Todo el año
Evolución	Necesitamos tratamiento antibiótico	Resolución espontánea

Cuadro 1.- Resumen de signos y síntomas de Enfermedad de los Legionarios y Fiebre de Pontiac. [4,20,24]

Diagnóstico de Laboratorio

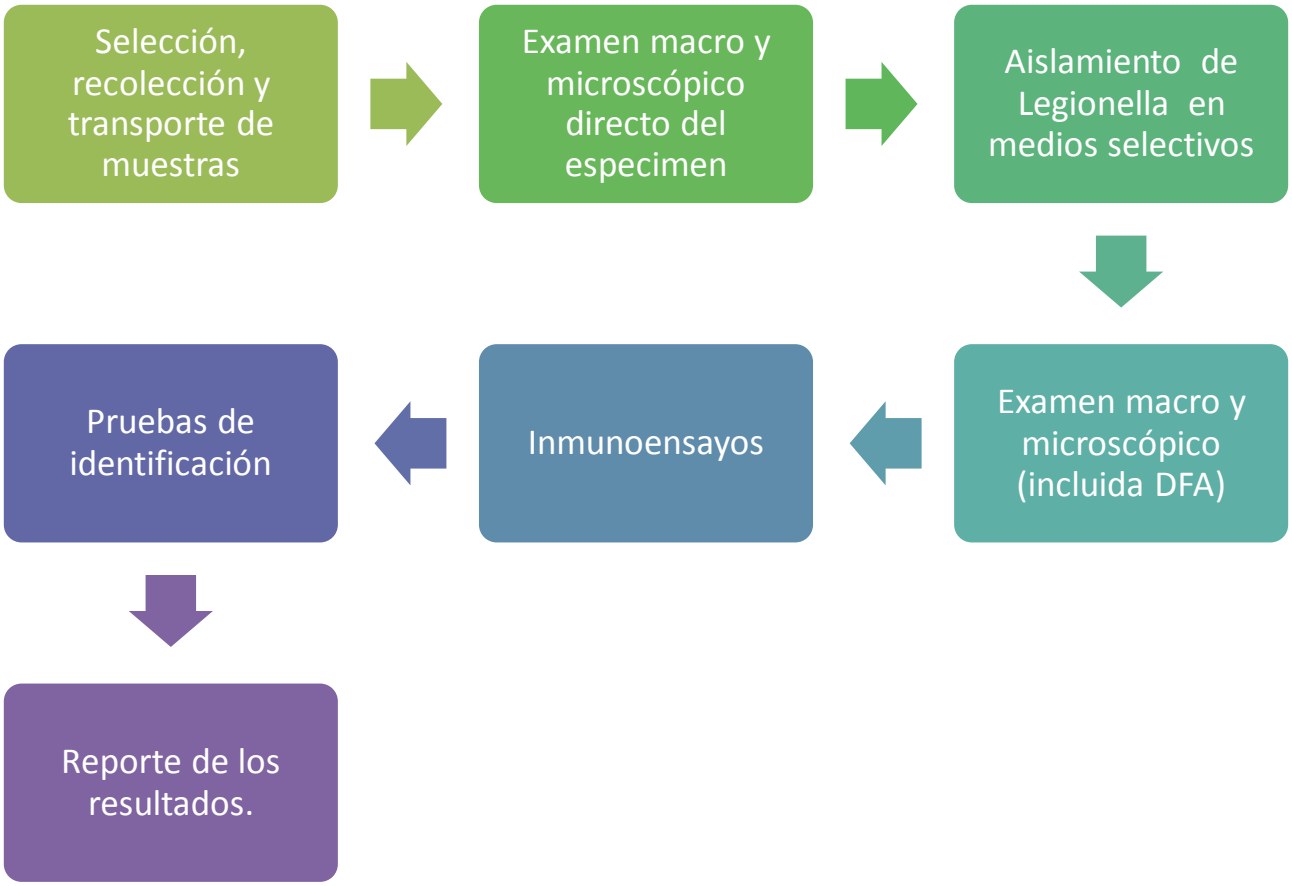
La presencia de una neumonía significativa acompañada de manifestaciones sistémicas puede orientar el diagnóstico, sin embargo las neumonías causadas por *Legionella* no son lo suficientemente diferentes de las acusadas por otros agentes como para poder fundamentar el diagnóstico sólo sobre los datos clínicos, por lo que resulta necesario recurrir a procedimientos de laboratorio. [5] Se pueden clasificar en dos grupos de acuerdo al **Cuadro 2**:

Métodos Directos	Métodos Indirectos
1. Detección de antígenos 2. Inmunofluorecencia directa (DFA) 3. Detección de ácidos nucleicos 4. Aislamiento	1. Inmunofluoresencia indirecta

Cuadro 2.- Métodos directos e indirectos utilizados en el laboratorio para la identificación de *Legionella* [20]

Para lograr el adecuado diagnóstico de una Legionelosis es necesario seguir un protocolo integral integrando tanto métodos directos como indirectos para así asegurar el correcto diagnóstico de *Legionella pneumophila* [20]

Los pasos a seguir para el diagnóstico o la confirmación de la Legionelosis en el laboratorio son los siguientes: [2]



a) Muestras adecuadas

El cultivo de secreciones del tracto respiratorio, tejidos y líquidos como el esputo, lavado bronco alveolar y bronquial dan el mayor rendimiento para el diagnóstico de enfermedad de los legionarios, en ocasiones los hemocultivos son positivos y muy rara en otros sitios extra pulmonares, como abscesos o en líquido peritoneal, pericárdico, válvulas cardiacas protésicas y abscesos intestinales dan resultados positivos. Los cultivos de riñón, hígado y bazo también a veces son positivos en casos fatales de enfermedad de los legionarios. No se ha logrado el diagnóstico por cultivo de la fiebre de Pontiac o encefalopatía sin neumonía. [4, 15,17]

Generalmente no se requieren de técnicas invasivas para obtener secreciones del tracto respiratorio, tejidos o líquidos, ya que el esputo es por lo general una muestra adecuada cuando se utilizan técnicas y medios selectivos. No obstante a veces se requiere de técnicas invasivas por las condiciones clínicas del paciente, principalmente para excluir otras causas de neumonía en el huésped inmunocomprometido. Algunas de estas técnicas invasivas son las obtenidas de aspirados transtraqueales, y de biopsias de pulmón son las que dan mayor rendimiento en aislamiento de *Legionella*, mientras que el líquido pleural da un rendimiento menor así como las muestras obtenidas por broncoscopia, como el esputo, mientras que las biopsias transtraqueales tienen bajo rendimiento. [15,17]

b) Recolección de muestras

Todas las muestras deben ser recogidas y transportadas en un recipiente estéril con tapa de rosca; si hay posibilidad de desecación, se debe agregar una pequeña cantidad de agua estéril, se debe evitar el uso de solución salina, ya que ésta es ocasionalmente inhibidora de *Legionella* por los efectos del sodio. Los médicos principalmente deben ser instruidos en el uso mínimo de solución salina cuando se obtienen muestras de broncoscopia, o aspirado transtraqueales. También los analgésicos como la Lidocaína principalmente es un inhibidor de *Legionella* y de otras bacterias, por lo que se debe utilizar la cantidad mínima en la broncoscopia para un óptimo rendimiento del cultivo. [15,17]

c) Transporte de muestras

No se requieren medios de transporte especiales, ya que las legionelas son generalmente muy resistentes, siempre que se evite la desecación y la exposición a una elevada molaridad (>0.01 M) de solución salina y amortiguadores inorgánicos. Todas las muestras deben de ser enviadas al laboratorio lo más pronto posible preferentemente en el curso de 2 horas después de su recolección para evitar el sobredesarrollo de bacterias contaminantes. Si se demora más de 30 min es mejor refrigerarla a 5 °C hasta su envío, La muestra debe ser congelada a -20 °C si la demora es de 24 a 48 horas, en caso de que las

muestras se tengan que conservar por días o semanas deben mantenerse a -70 °C o menos. [4, 15, 17]

d) Examen directo

Las legionelas pueden visualizarse en muestras utilizando varias técnicas de tinción específicas e inespecíficas. En general las técnicas de Gram, Giménez, y Dieterle, son menos sensibles que el examen con Anticuerpos Fluorescentes Directos (DFA) como se observa en la **Figura 5**, en la que se usan anticuerpos marcados con fluoresceína dirigidos frente a las especies de *Legionella*. La prueba es específica y rara vez se observan reacciones falsas positivas cuando se emplean preparaciones con anticuerpos monoclonales, sin embargo la sensibilidad es del 25 al 75 % ya que ésta depende del número de microrganismos de la preparación, su detección requiere de un gran número de microrganismos; así como también la preparación de anticuerpos es específica del serotipo o de la especie. La prueba del antígeno urinario ha sustituido al DFA ya en varios laboratorios. [15, 24]

El examen macroscópico de muestras pulmonares puede contribuir a que el anatomopatólogo seleccione las áreas más adecuadas para obtener material de cultivo o tinción con DFA, deben prepararse extendidos directos de exudados o preparados por contacto o muestras de material fresco de biopsia pulmonar, las improntas de pulmón como la de la **Figura 6**, y las muestras congeladas también son útiles para el diagnóstico. [4, 15]

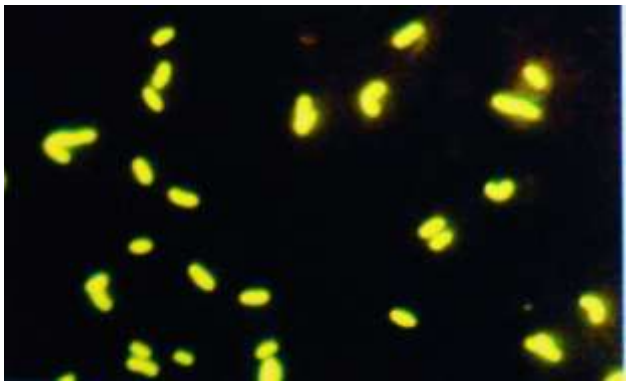


Figura 5.- *Legionella pneumophila* teñida con DFA o anticuerpos fluorecentes directos. [22]

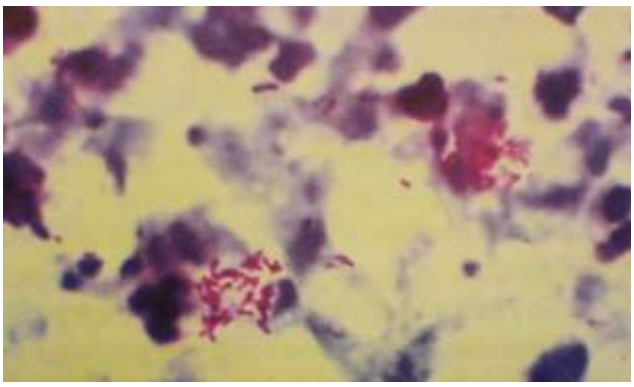


Figura 6.- Impronta de pulmones muestra a *L. pneumophila* (teñida de rojo) en el interior de los macrófagos alveolares[1]

La prueba del antígeno urinario es un enzimoinmunoanalisis (ELISA) que se emplea para detectar antígenos lipopolisacáridos solubles específicos de *Legionella* en la orina de los pacientes afectados. La sensibilidad de estas pruebas para el serotipo 1 de *Legionella pneumophila* es relativamente elevada (del 60 % -90 %) en especial en la orina concentrada, si bien la sensibilidad para otros serogrupos de esta especie son más bajas. Se ha identificado una lipoproteína específica de género asociada a la superficie celular en la orina de los sujetos infectados que podría representar una diana diagnóstica dotada de una mayor utilidad. Los antígenos se mantienen en la orina de los pacientes tratados y un 50 % obtiene resultados positivos tras un mes y un 25 % después de 2 meses [24]

e) Cultivo y Aislamiento

Aunque inicialmente resultó difícil hacer crecer a las legionelas, los medios disponibles en la actualidad han facilitado su cultivo (sensibilidad de 80-90 %), su fase intracelular replicativa es muy similar desde el punto de vista ultraestructural a su crecimiento en el agar. Como se ha comentado anteriormente, estas bacterias necesitan para su desarrollo L-Cisteína y sales de hierro (proporcionadas por la hemoglobina y el pirofosfato férrico), y es inhibido por sales de sodio y compuestos aromáticos. El medio más utilizado a menudo para su aislamiento es el Agar BCYE (agar tamponado con extracto de levadura y carbón) como se aprecia en la **Figura 7**. Este medio de cultivo contiene carbón vegetal para destoxificar el medio, eliminar el CO_2, y modificar la tensión superficial permitiendo así una proliferación más fácil de los microrganismos, así como extracto de levadura y α-cetoglutarato como fuentes de L-cisteína. [15, 22,33]

El tratamiento con ácido de especímenes contaminados con otras bacterias antes de su inoculación propicia aún mejor aislamiento de *Legionella*, En este procedimiento una alícuota del espécimen es diluido 1:10 con una solución de KCl-HCl al 0.2N y después agita por 5 minutos. Después se inocula con una porción del espécimen tratado con el ácido. Las placas se incuban en una jarra con vela de 35 a 37°C en una atmósfera húmeda, al incrementar el CO_2 sólo se estimula el crecimiento de *Legionella gormanii* de modo que es preferible la incubación en aerobiosis más que con CO_2 al 5-10 %, que puede inhibir algunas Legionelas. [17, 22, 24]

Las colonias son visibles de 3-4 días de incubación. Las placas se deben almacenar durante máximo 2 semanas antes de descartar. Los hemocultivos se almacenan durante un mes. A los 5 días las colonias miden de 3 a 4 mm de diámetro, su morfología colonial tal y como se aprecia en la **Figura 8** tiene un color blanco grisáceo, o verde azulado, son

brillantes, convexas y circulares, pueden exhibir un moteado granular interno similar al vidrio cortado. [17, 22, 24]

Figura 7.- Cultivo de Esputo en BCYE en placa. [17]

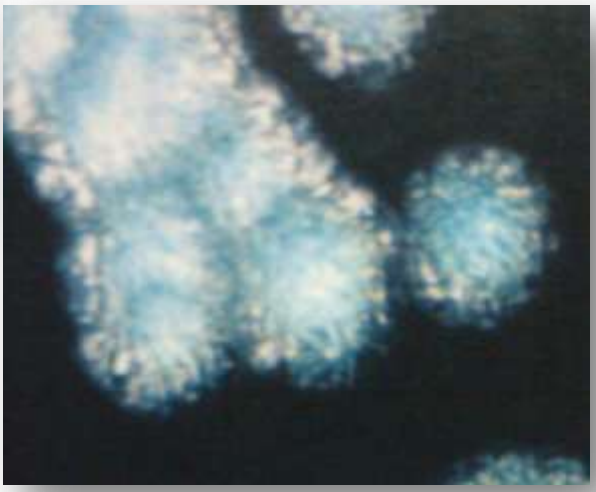


Figura 8.- Morfología colonial clásica de *Legionella pneumophila* en placa de BCYE [22]

f) Identificación

En la Identificación del género y la especie de un microrganismo como *Legionella*, el género es relativamente fácil requiriendo sólo de algunas técnicas serológicas como el antígeno urinario y la DFA así como de su cultivo y requerimientos metabólicos, no así la especie que es más compleja y a veces imposible, sin embargo la identificación de la especie no es de importancia, sólo para fines epidemiológicos. Con base en lo anterior en el **Diagrama 1** se expone una marcha diagnóstica para la identificación rápida de *Legionella*. [17, 21, 22]

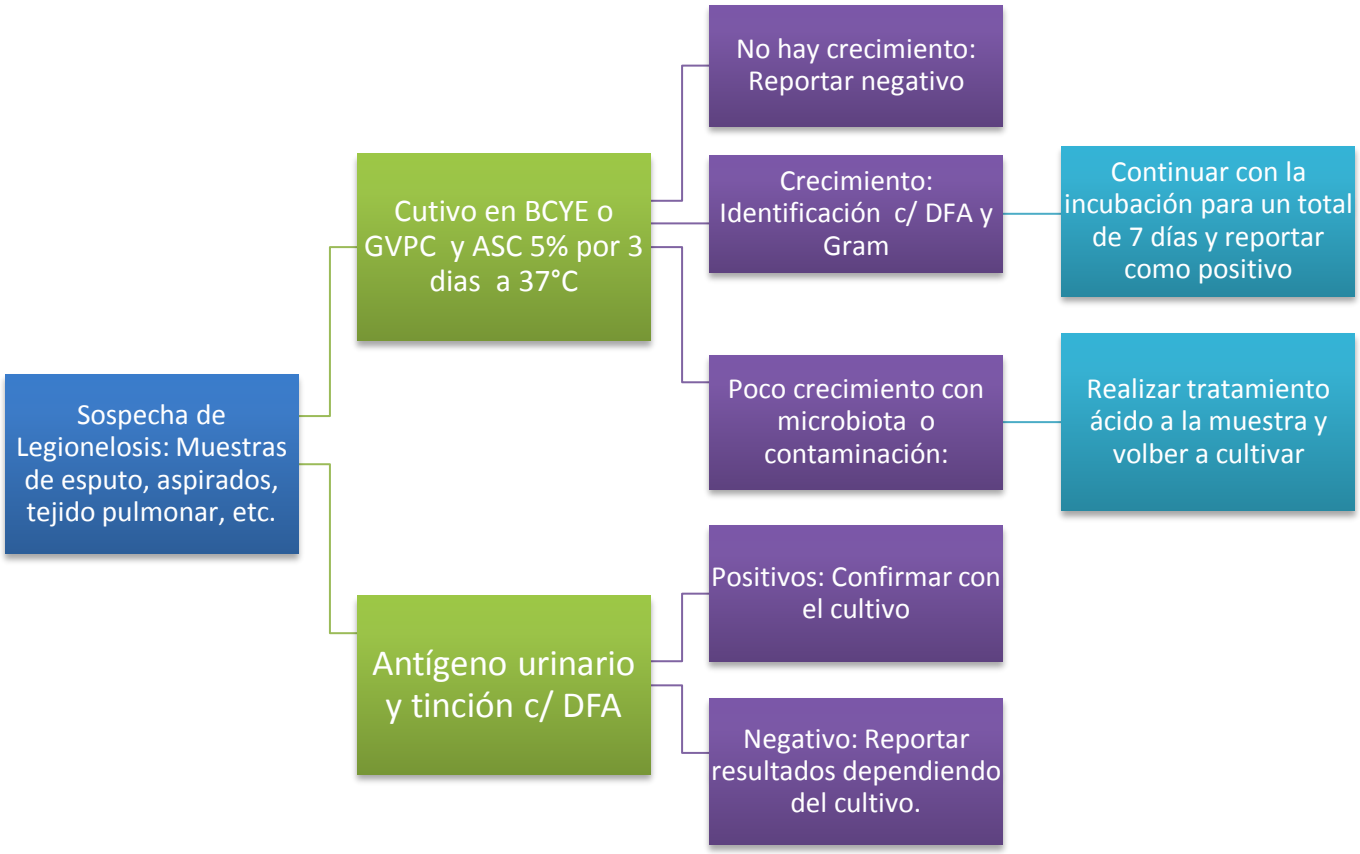


Diagrama 1.- Marcha diagnóstica para identificación rápida de *Legionella pneumophila*. BCYE: agar amortiguado con extracto de levadura y carbón, GVPC: Agarc modificado con glicina, vancomicina, polimixina B y cicloheximida.[17, 22]

g) Caracterización Bioquímica

Dado que las especies de *Legionella* son inertes desde el punto de vista bioquímico y muchas pruebas producen resultados dudosos las pruebas bioquímicas exhaustivas se utilizan poco, pues *Legionella pneumophila* no crece en los medios de prueba con hidratos de carbono comúnmente usados. Por esta razón los hidratos de carbono se incorporan a medios basales especialmente preparados para demostrar su utilización por *Legionella pneumophila*. Algunas de las pruebas para su diferenciación con otras especies importantes del género *Legionella* se muestran en la **Cuadro 3**. [21,22]

Especies	Fluoresencia con UV de 365 nm	Oxidasa	Flagelos	Gelatinasa	B- lactamasa	Hidrolisis de hipurato	Requiere L-Cisteina
L. pneumophila	-	+	+	+	+	+	+
L. gormanii	Azul- blanca	-	+	+	+	-	+
L. oakridgensis	Verde amarilla	-	+	-	+/-	-	-

Cuadro 3.- Características bioquímicas del género *Legionella* [21,22]

Epidemiología

Las legionelas son ubicuas y están distribuidas en el ambiente, por consiguiente la mayoría de los individuos está expuesta a las especies de *Legionella*; desde su descubrimiento se han realizado diagnósticos de legionelosis en diferentes regiones del mundo demostrando su amplia distribución, en la **Cuadro 4** se resumen los factores que intervienen en la infección por *Legionella.* [10, 20]

Reservorio	Factores de amplificación	Mecanismo de diseminación	Factores de predisposición
Abastecimiento de agua (hospital, hotel, domicilio)	Tanques de agua caliente (<50°C) Tuberías de distribución (sedimento, puntos muertos) Torres de refrigeración, condensadores de evaporación.	Sistemas de aire acondicionado, duchas, grifos, nebulizadores, humidificadores, remolinos de agua, equipos de terapia respiratoria	Inmunosupresión, diálisis, diabetes.

Cuadro 4.- Factores que interviene en la infección por *Legionella* [20]

Las legionelosis esporádica y epidémica tienen una distribución universal. Las bacterias suelen estar presentes en reservas naturales como las ya mencionadas anteriormente, además de que parasitan a las amebas del agua replicándose en éstas de manera similar a la que se da en los macrófagos, así como también sobreviven en las biopelículas formadas en las cañerías. En los EUA según el CDC se dan de 10,000 a 20,000 casos anuales de Legionelosis. [24]

En México sólo se han reportado dos casos con diagnóstico clínico de neumonía por *Legionella pneumophila*, sin pruebas de laboratorio confirmatorias y ninguno por aislamiento del agente causal, estos fueron del Estado de México y Guerrero. [38]

Hasta el momento, no ha sido notificado ningún brote de legionelosis en México, ni la bacteria ha sido aislada de ningún caso de neumonía, sin embargo es necesario investigar la presencia de esta bacteria en nuestro país, para iniciar las medidas que permitan controlar su aparición. Si el primer brote documentado en el mundo se dio en un Hotel, no es en estos lugares donde se circunscribe el problema, ya que el brote con mayor número de casos se registró en un hospital de Murcia, España en el año 2002 con más de 500 casos. [38]

Tratamiento, Prevención y Control

La mejor información sobre el tratamiento antimicrobiano aun proviene del brote epidémico original en Filadelfia, la causa de la legionelosis se desconocía por completo en ese momento y los casos se trataron con diversos regímenes terapéuticos. Los pacientes tratados con eritromicina evolucionaron mejor que aquellos que recibieron penicilinas, cefalosporinas o aminoglucósidos. Esto debido a que estos antibióticos no penetran los macrófagos y la *Legionella* se sigue multiplicando además de que la mayor parte de las bacterias del género *Legionella* producen β-lactamasa anulando los efectos de éstos. Algunos otros antibióticos eficaces que se utilizan son los macrólidos (acitromicina y claritromicina), o fluoroquinolonas (ciprofloxacino y levofloxacino). [24]

La prevención de la legionelosis exige la identificación del foco ambiental del microrganismo y la reducción de la carga microbiana, en la actualidad no se dispone de una vacuna contra las infecciones por *Legionella* aunque se encuentra en etapa de desarrollo. [24]

Para su control los sistemas de agua, sobre todo las torres de aire acondicionado y de enfriamiento por evaporación, así como las zonas estancadas de los sistemas de agua caliente deben desinfectarse o drenarse con regularidad para disminuir el número de microrganismos de *Legionella*, ya que la esterilización total suele ser imposible[33]

Problema de Investigación

Como ya se ha mencionado *Legionella pneumophila* es causante principalmente de una neumonía de tipo ”atípica” conocida como enfermedad de los Legionarios, sin embargo hay muchos agentes bacterianos causales de este tipo de neumonías, 5 son los agentes principales: *Chlamydophila sp, Legionella pneumophila, Mycoplasma pneumoniae, Streptococcus pneumoniae y Klebsiella pneumoniae*, por lo que es necesario establecer un protocolo de diagnóstico microbiológico de cada una de estas bacterias para obtener un diagnóstico acertado y objetivo de la neumonía del paciente que así lo requiera y poder establecer el tratamiento más efectivo para su alivio.

Es por ello que se elabora este manual integral de diagnóstico microbiológico de *Legionella pneumophila* que servirá de apoyo y referencia para QFB’s del área de bioquímica clínica en el módulo de Microbiología médica, así como también de otras carreras afines, de tal forma que se pueda obtener un diagnóstico efectivo y acertado en caso de que se sospeche de una neumonía atípica causada por esta bacteria, así como para obtener su aislamiento de posibles fuentes de contagio para su erradicación

Como se mencionó anteriormente en México sólo se han reportado dos casos de neumonía por *Legionella*, estos no se confirmaron con pruebas contundentes de laboratorio, estos fueron en Guerrero y Estado de México, sin embargo el European Working Group for *Legionella* Infections (EWGLI), una organización no gubernamental que hace vigilancia epidemiológica de los casos de legionelosis que ocurren en Europa desde 1987, asocia 46 casos ocurridos en turistas con su estancia en México entre 1990 y 2005.[1]

Objetivos

Elaborar un manual integral de diagnostico microbiológico para *Legionella pneumophila*, que servirá de apoyo a la materia de Microbiología médica del 9no semestre del área de Bioquímica Clínica, en el módulo de agentes etiológicos bacterianos que causan infecciones en el sistema respiratorio, para que una vez egresados sea más fácil su aplicación experimental en un laboratorio dando un diagnóstico efectivo y rápido de pacientes que sean aquejados por la enfermedad que causa.

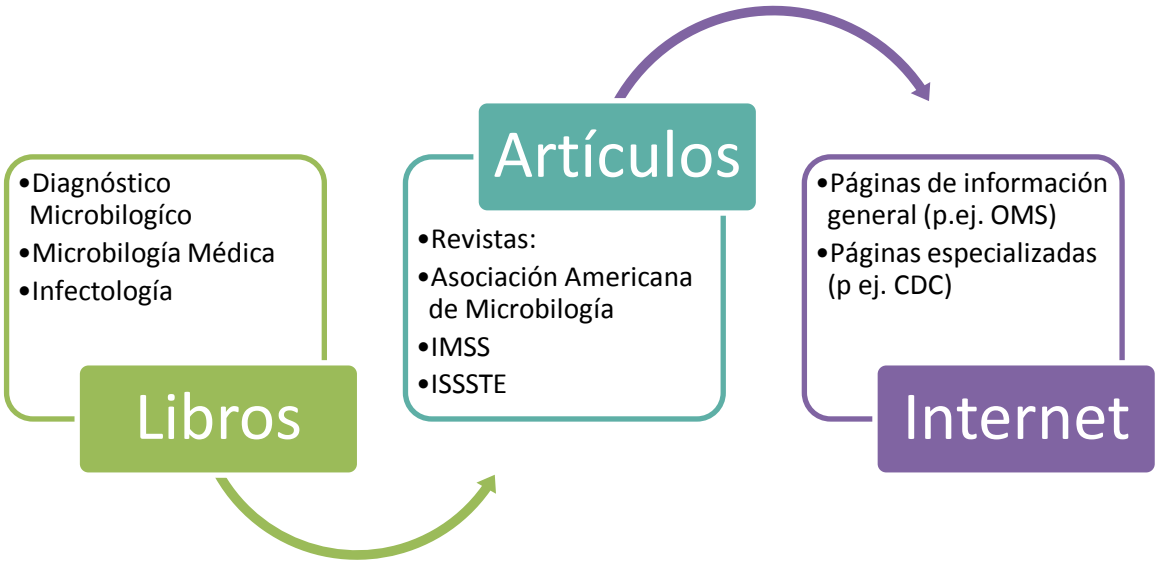
Diseño de Investigación 20

Tipo de estudio: Bibliográfico Monográfico

Variables:

- Independiente: Características de *Legionella pneumophila*
- Dependiente: Información recabada sobre *Legionella pneumophila*

Metodología:



Diseño del Material a desarrollar:

Introducción

1. Capítulo 1. Caracterización del Género Legionella
   - 1.1. Taxonomía
   - 1.2. Morfofisiología
   - 1.3. Estructura antigénica
   - 1.4. Factores de patogenicidad y virulencia
     - 1.4.1. Vías de asimilación del Hierro
     - 1.4.2. Replicación Intracelular
   - 1.5. Factores de inmunidad
   - 1.6. Legionelas de importancia médica
   - 1.7. Medios de cultivo
2. Capítulo 2. Agentes causales de Neumonía
   - 2.1. Anatomía del sistema respiratorio

2.2. Clasificaciones de la Neumonía
3. Capítulo 3. Enfermedades por *Legionella pneumophila*
3.1. Modo de Transmisión
3.2. Enfermedad de los legionarios, Legionelosis o Neumonía por *L pneumophila*
3.3. Fiebre de Pontiac
3.4. Infecciones extra pulmonares
4. Capítulo 4. Diagnóstico Microbiológico de *Legionella pneumophila*
4.1. Recolección, transporte y conservación de la muestra
4.2. Examen directo macro y microscópico
4.3. Cultivo y Aislamiento
4.4. Pruebas de identificación para *Legionella pneumophila*
4.4.1. Tinciones
4.4.2. DFA: Anticuerpos Fluorescentes Directo
4.4.3. Antígeno Urinario
4.4.4. Serología
4.4.5. Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR
4.4.6. Caracterización Bioquímica
4.4.7. Sensibilidad a Antimicrobianos
4.4.8. Pruebas Complementarias
4.5. Resumen: Marcha Diagnóstica
4.6. Diagnóstico Diferencial
4.6.1. Diferenciación entre bacterias que causan Neumonía.
4.6.2. Mycoplasma pneumoniae
5. Capítulo 5. Tratamiento
6. Capítulo 6. Epidemiología
6.1. *Legionella* en Europa
6.2. *Legionella* en México y Latinoamérica
7. Capítulo 7. Prevención y Control
8. Capítulo 8. Anexos
8.1. Casos Clínicos
8.2. Técnicas de Tinciones
Referencias Bibliográficas

Resultados 22

A continuación se muestra el manual de diagnóstico microbiológico elaborado como resultado de esta investigación.

ÍNDICE

Introducción..... 25
1. Capítulo 1. Caracterización del Género *Legionella*..... 33
   1.1 Taxonomía..... 33
   1.2 Morfofisiología..... 33
   1.3 Estructura antigénica..... 35
   1.4 Factores de patogenicidad y virulencia..... 36
      1.4.1 Vías de asimilación del Hierro..... 42
      1.4.2 Replicación Intracelular..... 44
   1.5 Factores de inmunidad..... 47
   1.6 Legionelas de importancia médica..... 53
   1.7 Medios de cultivo..... 54
2. Capítulo 2. Agentes causales de Neumonía..... 57
   2.1 Anatomía del sistema respiratorio..... 57
   2.2 Clasificaciones de la Neumonía..... 58
3. Capítulo 3. Enfermedades por *Legionella pneumophila*..... 63
   3.1 Modo de Transmisión..... 63
   3.2 Enfermedad de los legionarios, Legionelosis o Neumonía por *L. pneumophila*..... 65
   3.3 Fiebre de Pontiac..... 68
   3.4 Infecciones extra pulmonares..... 68
4. Capítulo 4. Diagnóstico Microbiológico de *Legionella pneumophila*..... 71
   4.1 Recolección, transporte y Conservación de la Muestra..... 72
   4.2 Examen Directo Macro y Microscópico..... 73
   4.3 Cultivo y Aislamiento..... 75
   4.4 Pruebas de identificación para *Legionella pneumophila*..... 78
      4.4.1 Tinciones..... 78
      4.4.2 DFA: Anticuerpos Fluorescentes Directo..... 80
      4.4.3 Antígeno Urinario..... 81
      4.4.4 Serología..... 82
      4.4.5 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)..... 83
      4.4.6 Caracterización Bioquímica..... 84
      4.4.7 Sensibilidad a Antimicrobianos..... 86
      4.4.8 Pruebas Complementarias..... 86
   4.5 Resumen: Marcha Diagnóstica..... 88
   4.6 Diagnóstico Diferencial..... 90
      4.6.1 Diferenciación entre bacterias que causan Neumonía. 90
      4.6.2 Mycoplasma pneumoniae..... 90

5. Capítulo 5. Tratamiento…… 92
6. Capítulo 6. Epidemiología…… 95
    6.1 *Legionella* en Europa…… 97
    6.2 *Legionella* en México y Latinoamérica…… 100
7. Capítulo 7. Prevención y Control…… 102
8. Capítulo 8. Anexos…… 106
    8.1 Casos Clínicos…… 106
    8.2 Técnicas de Tinciones…… 110

Introducción

"La serie de muertes provocadas por un brote epidémico de una enfermedad respiratoria misteriosa en Filadelfia, se incrementó de 2 a 25, por lo que los investigadores médicos aceleraron los esfuerzos para buscar una sustancia química o un veneno como posible causa de la enfermedad", esto publicaba el diario "The New York Times" el 7 de agosto de 1976, sin sospechar aun que la causa de esta epidemia era un nuevo género de bacterias, y no sería hasta principios de Enero de 1977 cuando el doctor Joseph McDade que se muestra en la **Figura 1,** de la Central for Disease Control (CDC) logró aislar el agente etiológico de este trastorno, resolviendo así el enigma y dio pie a la creación de esta nueva familia de bacterias: la *Legionellaceae*.[1]

El mundo que nos rodea está constituido de un complejo y denso contenido de microbios que incluye bacterias, hongos, parásitos y virus, sin embargo sólo una pequeña cantidad de éstos ha sido catalogada, el resto no se conoce porque es incultivable y afortunadamente no causa daño al hombre. La virulencia es el resultado de una estrategia que ha evolucionado para permitir a los microrganismos replicarse dentro del hospedero pero que inevitablemente le produce daño, estas estrategias especializadas son raras en microrganismos que no han evolucionado junto con el hospedero, pese a esto hay algunas como *Legionella pneumophila* que logró pasar de su medio ambiente acuático a una torre de enfriamiento de aire acondicionado de un hotel causando el primer brote conocido en 1976.[2]

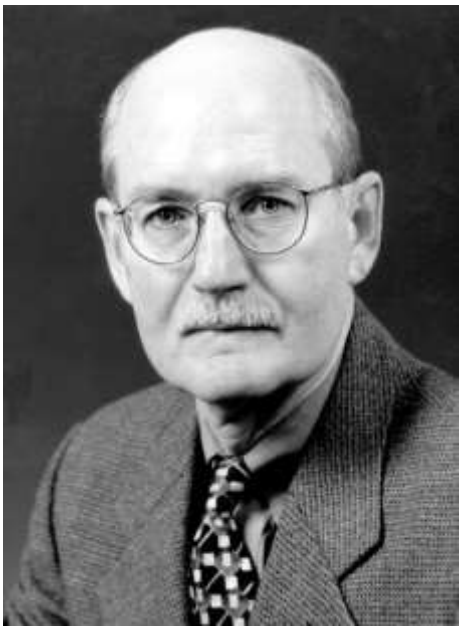


Figura 1. Joseph E McDade. El logro aislar el agente causal de la enfermedad de los Legionarios en 1977 [3]

Durante el verano de este año se documentó una epidemia explosiva de neumonía de etiología desconocida entre las 4000 personas veteranas, excombatientes norteamericanos que concurrieron a una convención de la Legión Americana de Pensilvania en un Hotel de Filadelfia. Esta enfermedad poli sistémica que también se asociaba con una neumonía se designó con el nombre de "enfermedad de los Legionarios". Se documentaron 221 casos en total; 34 de estos

Figura 2. En 1976 en la convención de la Legión de Pensilvania, de los veteranos excombatientes que asistieron a Filadelfia, 221 contrajeron una nueva y extraña enfermedad, de la cual 34 perdieron la vida [8]

pacientes fallecieron, a principios de 1977 como se ve en la **Figura 2,** el doctor Joseph McDade del CDC de Atlanta, aisló el agente etiológico de este trastorno, este descubrimiento resolvió un enigma médico importante y dio lugar en 1978 a la nueva familia de bacterias: la *Legionellaceae* [4, 5, 6, 7, 8]

Sin embargo el primer aislamiento de *Legionella pneumophila* tuvo lugar en 1947 de la sangre de un paciente con enfermedad respiratoria febril y se le caracterizó como semejante a la *Rickettsia* al ser también un patógeno intracelular, pero el primer episodio conocido y bien documentado de la enfermedad de los legionarios se produjo en 1957 en Austin Minnesota, entre esta fecha y 1976 se registraron varios brotes diferentes como el registrado en 1965 en el hospital psiquiátrico de Santa Isabel en Washington DC, 81 pacientes internados en esta institución contrajeron una enfermedad respiratoria que causó 15 muertos, estudios posteriores en sueros congelados por 12 años demostraron que *Legionella pneumophila* fue la causante de estas muertes. [7, 9]

Legionella también se relacionó así mismo con un brote de fiebre de corta duración y sin neumonía (Fiebre de Pontiac), que había afectado en 1968 al personal sanitario y a los visitantes del Oakland County Health Departament en Pontiac, Michigan EUA. *Legionella* es una causa importante de neumonías graves, adquiridas tanto en la comunidad como en el medio hospitalario que se presentan esporádicamente o bien en forma de brotes, en conjunto representan del 1 al 5% de las neumonías adquiridas en la comunidad, y también pueden ser responsables de infecciones extra pulmonares.[7, 10]

“Hay muchas razones por lo que uno puede pensar que en esta mitad del siglo XX será el fin de una de las más importantes revoluciones sociales en la historia, la virtual eliminación de las enfermedades infecciosas, que han sido un factor significante de la vida

de esta sociedad" esto declaraba el Premio Nobel Mc Farlane Burnet observado en la **Figura 3** en 1962. La predicción de Burnet reflejaba el imperante pensamiento de que en este periodo, particularmente con el rápido avance en el desarrollo de las vacunas y la prevalencia en la disponibilidad de los antibióticos, llegaría a su fin. Pero a pesar de la erradicación de la viruela en la década de los 70´s, y los actuales esfuerzos para eliminar la polio, enfermedades infecciosas que quedaron atrás ahora causan serios problemas, aun en naciones con desarrollo e industrialización. [11]

Figura 3. Frank McFarlane Burnet (1880-1985). El predecía el fin de las enfermedades infecciosas para la 2da mitad del siglo XX [12]

Por ejemplo en 1991 la epidemia del cólera reapareció en Sudamérica después de una larga ausencia, y durante los siguientes 3 años. La Organización de Salud Panamericana recibía reportes de más de 1 millón de casos de cólera y 9,000 muertes. En 1990 la epidemia de la difteria comenzó a emerger en los nuevos estados independientes de la Unidos Soviética, en 1996 aproximadamente 125,000 casos de difteria y 4,000 muertes han sido reportadas. En Estados Unidos las muertes causadas por agentes infecciosos ha incrementado significantemente de entre 1980 a 1992, por ejemplo las muertes causadas por enfermedades respiratorias incrementaron en un 32%, y las muertes causadas por septicemia incrementaron en un 83%. Debido a que se ha extendido la prevalencia de la resistencia a los antimicrobianos, se han exacerbado algunas enfermedades infecciosas, y complicado tratamientos de pacientes infectados. [11]

Desde 1977 por lo menos 30 nuevos agentes Infecciosos o enfermedades han sido identificadas, en el **Cuadro 1** se muestra una lista de algunos de ellos, desde el descubrimiento del virus del Ebola en 1977 hasta el virus del Nipah en 1999. Algunos otras ya se conocían pero no como agentes patógenos para el hombre como el *Cryptosporidium parvum* que se asociaba solo a animales. [11]

En la década de los 90´s el Instituto de medicina convocaba a una ponencia especial sobre las enfermedades infecciosas emergentes. Esta reunión publicaba en 1992 un resumen de la existencia de problemas y proporcionó recomendaciones para la prevención de

enfermedades infecciosas, y describieron 6 causas básicas sobre las enfermedades infecciosas emergentes: [11]

Cuadro 1. Enfermedades descubiertas y emergentes de las últimas décadas. [11, 13]

Año	Agente infeccioso	Enfermedad que causa
1977	Virus del Ebola	Fiebre hemorrágica del Ebola
1977	*Legionella pneumophila*	Enfermedad de los Legionarios
1977	*Campylobacter sp*	Patógeno Global entérico
1982	*Escherichia coli* O157	Colitis hemorrágica
1982	*Borrelia burgdorferi*	Enfermedad de Lyme
1983	*Helicobacter pylori*	Ulcera gástrica
1983	VIH	SIDA
1991	*Ehrlichia chaffeensis*	Erlichiosis
1993	Hantavirus	Síndrome pulmonar por hantavirus
1993	*Bartonella henselae*	Angiomastosis bacilar
1994	Herpes Virus8	Sarcoma de Kapossi
1995	Virus del Hendra	Meningoencefalitis
1997	Virus de la influenza H5N1	Influenza
1999	Nipah virus	Encefalitis
2007	*Vibrio cholerae*	Cólera
2005	*Mycobacterium tuberculosis*	*Tuberculosis*
2008	Flavivirus o virus de la fiebre amarilla	Fiebre amarilla

1. El comportamiento demográfico de los seres humanos: El tremendo incremento de la población humana va cambiando drásticamente la ecología del mundo y con ello la fauna infecciosa.

2. La industria y la tecnología: La nueva tecnología es usualmente asociada con mejoras en la calidad de vida, pero ello también conlleva a la aparición de nuevos problemas y desafíos, por ejemplo la enfermedad de los Legionarios, la cual es asociada a los sistemas de aire acondicionado.

3. El desarrollo económico y el uso del suelo: La construcción de la presa el Cisne, en la década de los 60´s fue seguida de la aparición de varios brotes de la fiebre de Rift Valley en la década de los 70´s, debido al incremento de la población del mosquito transmisor.

4. El Transporte y comercio internacional: Brotes de Meningitis han sido asociados con la anual peregrinación de miles de árabes hacia la Meca, así como la resistencia del gonococo a los antibióticos, se ha acelerado por los frecuentes viajes que realizan las personas.

5. Cambios y adaptación microbiológica: Por ejemplo el brote del virus de la Influenza H5N1, surgido en Hong Kong en el invierno de 1997-1998.

6. Estropeo de las medidas de salud: La falta de asignación de personal de vigilancia de enfermedades causadas por alimentos causo grandes brotes en la década de los 90´s en los Estados Unidos.

Capítulo 1 Características Microbiológicas del Género *Legionella*

El género *Legionella* adquiere su nombre del brote epidémico que surgió en la convención de Legionarios Estadounidenses, la designación de la especie que es la principal patógena para seres humanos: *Legionella pneumophila*, refleja su propensión a causar neumonía, hoy se sabe que este género es un saprófito acuático ubicuo es decir tiene una gran distribución en el ambiente. [1]

1.1 Taxonomía

La familia se encuentra dentro del orden taxonómico *Legionellales*, que incluye las familias *Legionellaceae* y *Coxiellaceae*. *Coxiella burnetii*, un microrganismo intracelular obligado y agente causal de la fiebre Q, el más importante de la familia *Coxiellaceae*. Dentro de la familia *Legionellaceae*, gracias a los análisis de ADN se dividió en 3 géneros: *Legionella, Tatlockia, y Fluoribacter*, sin embargo estos dos últimos no se han usado ni aceptado ampliamente y se emplea el género *Legionella* para nombrar universalmente a todas las especies, ya que el género *Legionella* es el más importante y el único que se encuentra en seres humanos. Se han encontrado 50 especies de las cuales 20 sólo se han reportado aisladas de seres humanos, *Legionella pneumophila* comprende aproximadamente 16 serotipos, el serotipo 1 es el causante de la epidemia de 1976. [14, 15, 16, 17]

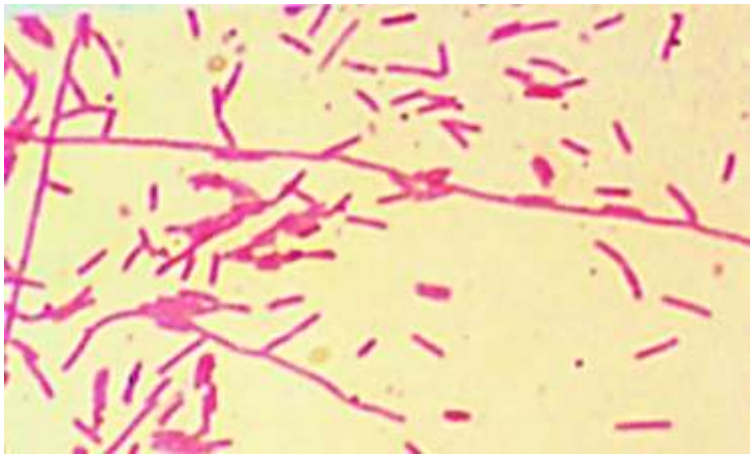


Figura 4.– *Legionella pneumophila* con tinción de Gram utilizando fucsina básica como colorante de contraste: estos microrganismos captan débilmente la fucsina y casi nada la safranina[18]

1.2 Morfofisiología

Son bacilos aerobios trofoselectivos es decir nutricionalmente exigentes y que no son cultivables en medios convencionales, son pleomórficos al presentar una forma y tamaño variables, según la fuente y condiciones de

desarrollo. En tejidos infectados y secreciones son pequeños bacilos o cocobacilos uniformes de aproximadamente 0.5 por 1 a 2 µm; cuando se desarrollan en placas de cultivo son pequeños bacillos pleomorfos en forma y tamaño de 0.5 por 2 µm o bien formas filamentosas de hasta 100 µm de longitud. A pesar de tener una pared celular gramnegativa típica no es visible con tinción de Gram, ya que la safranina la tiñe muy levemente, siendo necesario en caso de no usar otro método, utilizar fucsina básica como colorante de contraste tal y como se observa en la **Figura 4**., por lo que es necesario recurrir a otras técnicas, como la tinción de Giménez que es más eficaz y rápida que la de Gram, o de impregnación argéntica (de plata) como la de Dieterle, que permite identificar legionelas en tejidos fijados con parafina. [1, 9, 15, 16, 18]

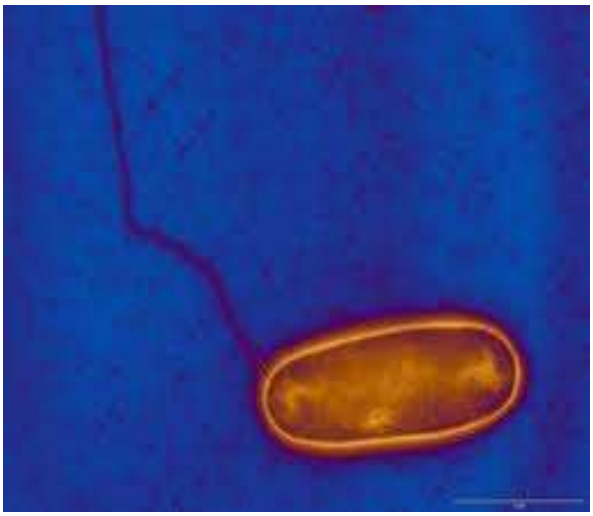


Figura 5.– Micrografía de *Legionella pneumophila* [19]

Son carentes de cápsula, no esporulados, dotados generalmente de un flagelo polar único y numerosas fimbrias o pilis como se observa en la **Figura 5**, algunas otras cepas presentan más flagelos polares, subpolares y laterales, otra característica interesante es la existencia en su pared de una membrana citoplasmática trilaminar interna, una capa de peptidoglucano y una membrana trilaminar externa. También tiene una elevada proporción de ácidos grasos de cadena ramificada y no ramificada, lo que proporciona a estos microorganismos un perfil cromatográfico de ácidos grasos especifico, rasgo útil para su identificación. La toxicidad del lipopolisacarido (LPS) de *Legionella pneumophila* es significativamente inferior que la de otras bacterias gramnegativas como *Neisseria* y enterobacterias, esto se ha atribuido a la constitución química de las cadenas laterales de los LPS, que constituyen un homopolímero de un carbohidrato poco común: el ácido legioamínico, que confiere a la superficie celular la característica de ser fuertemente hidrófoba. Se ha postulado que el estado hidrófobo puede favorecer la adherencia de las células bacterianas a las membranas o su concentración en aerosoles. [1, 16, 18, 20]

No oxidan ni fermentan azúcares es decir es asacarofílica y utilizan aminoácidos como fuente primaria de energía, contiene catalasa, al igual que todos los miembros de la familia *Legionellaceae*, sin embargo la reacción es débil cuando se compara con la de otras bacterias catalasa positivas. Pese a su diversidad todas las especies de *Legionella* tienen requerimientos nutricionales absolutos de L-cisteína en el aislamiento primario y todas, a

excepción de una especie *(L. oakridgensis*), requieren de la presencia de L- cisteína en los medios de cultivo para su óptimo desarrollo en las siguientes fases de su identificación. La mayoría de las especies crecen mejor en medios con aire humidificado y otras con un 2-5% de CO_2, su pH óptimo es de 6.8 a 6.9.[9, 15, 16]

Aunque sólo se han definido unas pocas características del cultivo y bioquímicas, éstas son suficientes para distinguir a *Legionella pneumophila* de otras bacterias principalmente por sus requerimientos de L- Cisteína y sales de hierro, en ocasiones con HCl para obtener un entorno ácido y logre crecer en medios de laboratorio. Aunque desarrolla de 25 a 42 °C su temperatura óptima es de 35 °C en aire con o sin el CO_2 del 2 a 5%. Entre otras características bioquímicas es oxidasa negativa, ureasa negativa, reducción de nitrato negativo, gelatinasa positiva y β-lactamasa positiva.[9, 21]

Legionella se encuentra fácilmente en organismos naturales acuáticos y algunas especies se han recuperado del suelo. Los organismos pueden sobrevivir bajo un amplio rango de condiciones, incluyendo la temperatura que puede variar desde los 0° a los 68°, con un pH de 5.0 a 8.5 y en concentraciones de oxígeno disuelto de 0.2 a 5.0 ppm en agua, la temperatura es un determinante crítico para la proliferación de *Legionella*. Algunas bacterias comensales tales como *Empedobacter brevis, Pseudomonas, Alcaligenes, Acinetobacter*, y algas Verde azules (*Cianobacterium sp*) pueden estimular el crecimiento de *Legionella* en el ambiente acuático. *Legionella* también puede infectar y multiplicarse dentro de amebas que viven en el suelo y en el agua, por ejemplo: *Hartmanella, Acanthamoeba y Naegleria*. También se ha aislado de protozoos ciliados, he incluso amebas de tanques de agua caliente. [22]

Cuando el protozoario huésped se rompe, grandes números de *Legionella* móviles son liberados, esto ha sugerido que *Legionella* pudiera ser transmitida a los humanos por inhalación de vesículas ameboideas, sin embargo no ha habido evidencia clínica de esta teoría. Los quistes de las amebas también contribuyen a la supervivencia de la *Legionella* cuando hay un entorno desfavorable como niveles elevados de cloro. [22]

1.3 Estructura antigénica

La diversidad antigénica de *Legionella pneumophila* se hizo evidente poco tiempo después de su identificación, al comprobarse que cepas aisladas con posterioridad a las causantes del brote de 1976 no reaccionaban con los sueros que habían sido utilizados para la identificación de aquellas. Sucesivamente fueron describiéndose nuevos serogrupos y además otras especies adicionales que compartían varias características, pero que diferían en su homología de ADN y en los antígenos principales de la superficie celular. [7]

Los organismos del género *Legionella* poseen dos clases principales de antígenos. En la superficie celular existe un antígeno soluble, termolábil, identificado como un complejo de elevado peso molecular constituido por una asociación lípido-proteína-hidrato de carbono, en la que la fracción antigénica parece residir en la fracción polisacárida y la responsable de su especificidad de serogrupo. Este complejo por su estructura química y su actividad biológica resulta similar más no idéntico a las clásicas endotoxinas de las bacterias gramnegativas.[7, 20]

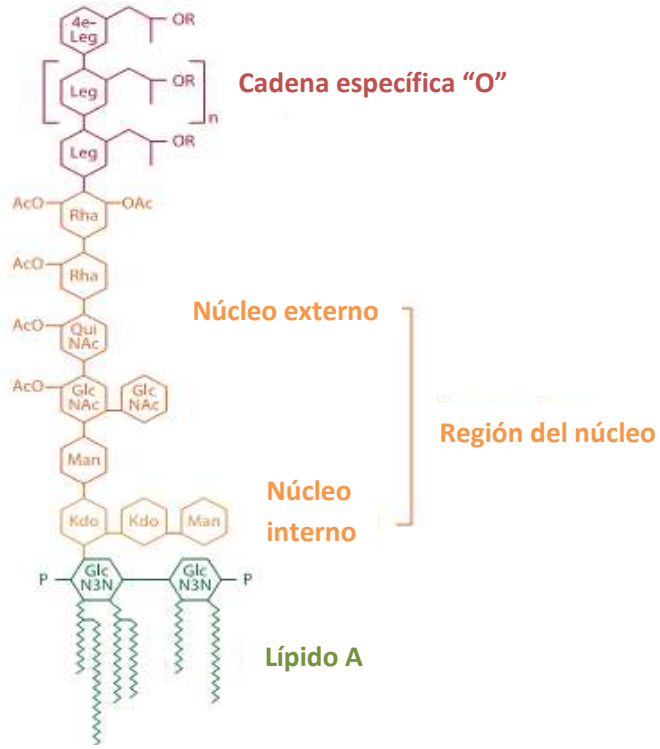


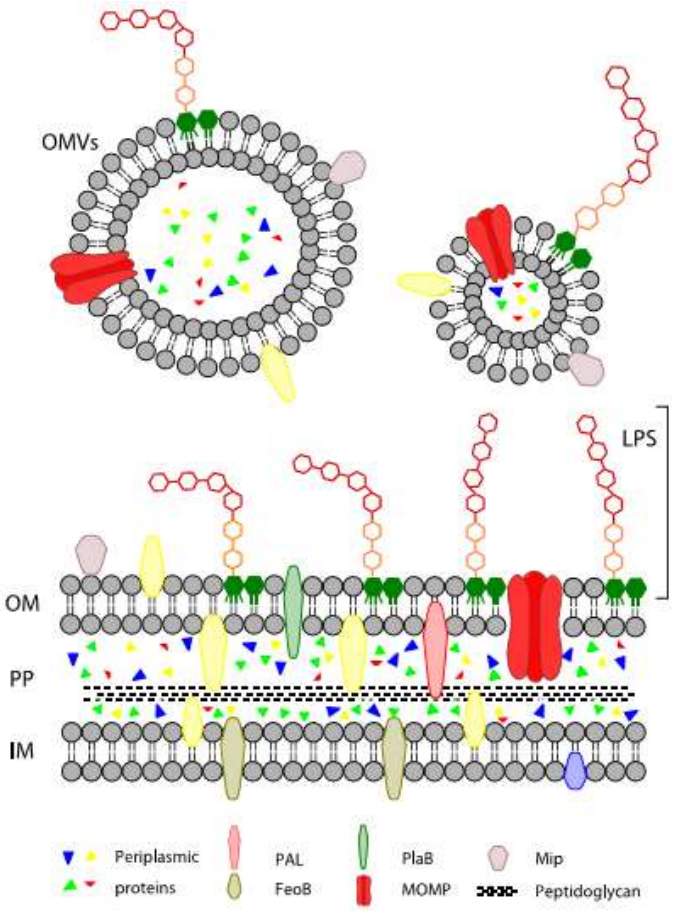
Figura 6.- Estructura química de LPS de *Legionella pneumophila*, en ésta estructura se observan 3 regiones: cadena específica-O, región del núcleo y el Lípido A. Leg: Derivados de Ácido Legioamínico, 4e-Leg: derivados de ácido 4-epilegioamínico, Rha: ramnosa, Man: Manosa, QuiNAC: Acetilquino-vosamina, GlcNAc: Acetil glucosamina, Kdo: ácido 3- desoxi-d-mano-oct-2-ulosónico[23]

Como se observa en la **Figura 6** las moléculas de LPS se componen de la cadena especifica O, la región del núcleo, y el componente lípido A, que es también denominado endotoxina. La cadena O y el núcleo constituyen la región de polisacárido de los LPS, mientras que los lípidos A representan la parte de la molécula que ancla el LPS en la membrana externa. En comparación con el LPS de otras bacterias gramnegativas, estos LPS tiene una estructura única. Debido a los altos niveles de ácidos grasos largos, ramificados en el lípido A y niveles elevados de grupos O-y N-acetilo, lo que los hace altamente hidrofóbicos, mientras que el núcleo es hidrófilo. El poder inmunógeno de tales antígenos reside en la fracción polisacárido y su elevado peso molecular que constituye un factor importante en la respuesta de anticuerpos por parte del huésped.[7, 23]

1.4 Factores de patogenicidad y virulencia

L pneumophila es notable por su propensión para atacar el pulmón dando origen a una neumonía necrosante de focos múltiples, desde el punto de vista microscópico, el proceso afecta a los alveolos y los bronquiolos terminales, respetando relativamente los

bronquiolos de mayor calibre. El exudado inflamatorio provocado, contiene fibrina, neutrófilos polimorfonucleares (PMN), macrófagos y eritrocitos. *Legionella pneumophila* logra causar tales daños ya que es un patógeno intracelular facultativo, su patogenicidad depende de su capacidad de sobrevivir y multiplicarse en células de la serie monocitos-macrófagos. Las bacterias inhaladas de *Legionella* alcanzan los alveolos, donde se unen a su objetivo, el macrófago alveolar. En este proceso, se ayudan por medio de pilosidades y proteínas de membranas de la pared celular (OMP) las cuales se unen a componentes del complemento. [1]



Diferentes presentaciones de la infección por *Legionella pneumophila* pueden ser influenciadas por severos factores, en los que incluye la habilidad de los organismos para entrar, sobrevivir, y multiplicarse dentro de las células del huésped, especialmente de los macrófagos bronco alveolares y la habilidad de producir enzimas proteolíticas causando estas severas infecciones.[20, 24]

Si bien los mecanismos de virulencia son complejos y no se conoce el mecanismo exacto por el cual *Legionella pneumophila* logra causar enfermedad, su capacidad de evitar la destrucción por las células fagocitadas del huésped desempeña un papel significativo en el proceso infeccioso, además de otros factores fundamentales para la infección intracelular [25]

Figura 7.-Vista de la pared celular de *Legionella pneumophila*: CP: citoplasma; LPS: Lipopolisacáridos: OM: membrana externa; PP: periplasma; IM: Membrana interna; OMV´s: Vesículas de membrana externa; PAL: Peptidoglicano asociado a lipoproteína; FeoB: transportador de Hierro; MOMP: Proteína mayor de la membrana externa; Mip: Potenciador de infectividad a macrófagos[23]

La envoltura bacteriana juega un papel crucial en la patogénesis de las enfermedades infecciosas, comenzando desde el interior hacia el exterior de la pared celular se divide en 3: Membrana Interna (IM), Periplasma (P) y Membrana Externa (OM) como se esquematiza en la **Figura 7**.[23]

La IM es una bicapa lipídica con componentes integrados de diferentes sistemas, incluyendo maquinarias de la absorción de hierro, la cadena respiratoria y el sistema de destoxificación entre otras que se mencionan en el **Cuadro 2**. La más importante es la regulación de la adquisición del hierro que es crucial para el crecimiento de *Legionella pneumophila* por un transportador de ion ferroso (FeoB), que media la captación de Fe^{2+}, así como para el crecimiento óptimo bajo condiciones limitantes de hierro tanto en amebas como en macrófagos, y matar eficientemente a los macrófagos. [14, 23]

Cuadro 2. Proteínas de Membrana Interna asociadas a la virulencia [23]

Proteína	Función Molecular	Rol en la Virulencia
FeoB	Transportador ferroso GTP-dependiente	Completa virulencia en ratones, mata macrófagos, media captación de ion Fe^{2+}
IraA/IraB	Péptido transportador	Consumo de hierro, infección de macrófagos humanos y puercos de guinea.
Multi-cobre oxidasa	Potencial oxidación del ion Ferroso	Replicación extracelular
LadC	Hipotético adenilato ciclasa	Adhesión a macrófagos, replicación intracelular
TatB	T2S, funciones adicionales	Replicación Intracelular en macrófagos humanos, bajo crecimiento en condiciones limitantes de hierro.

El espacio periplásmico es una capa de tipo gel compuesta de proteínas solubles y de peptidoglicano fuertemente reticulado, ubicadas entre las membranas interior y exterior, se enriquece en proteasas, nucleasas y otras enzimas degradativas. Por lo tanto, el periplasma se ha llamado un "precursor evolutivo de los lisosomas de las células eucariotas". Se ha demostrado que las enzimas que se encontraron principalmente en el periplasma, tales como metaloproteasas, fosfatasas, isomerasas, entre otras, depende en mucho de su liberación al exterior de dos sistemas de secreción, los conocidos como sistemas proteicos de secreción tipos: II y IV que parte de su maquinaria está en el

periplasma. Diversas fosfatasas ácidas, una ARNasa, metaloproteasas de zinc, mono, di, y triacilglicerolipasa, una fosfolipasa A, una lisofosfolipasa A, y una fosfolipasa C, son todas ellas secretadas por el sistema II, ciertas mutaciones en los genes que codifican el sistema de secreción II disminuyen la infectividad a los macrófagos, protozoos y ciertos animales. [14, 23]

También se han localizado otros factores de patogenicidad en el periplasma que se resumen en el **Cuadro 3**, como una superóxido dismutasa de cobre-cinc, que proporciona resistencia a aniones superóxido tóxicos así como también se precisa una peroxidasa-catalasa KatA y KatB que también contribuyen a una infección intracelular efectiva. La fosfotransferasa fosfoenolpiruvato de *Legionella* y proteína HtrA potencian el crecimiento intracelular y la virulencia. La adquisición de hierro, importante para la replicación intra y extracelular, implica entre otras cosas, la secreción de un quelante férrico (el sideróforo legiobactina) y una reductasa férrica periplásmica.[14, 23]

Cuadro 3. Proteínas del periplasma asociadas a la virulencia [11]

Proteína	Función Molecular	Rol en la Virulencia
Cobre- Zinc Súper óxido dismutasa	Eliminación de Radicales superóxido	Crecimiento estacionario de supervivencia.
Kat A y B	Degradación de H_2O_2	Óptima Infección de macrófagos y amebas (optima función del Dot/Icm)
IcmX	DNA Polimerasa	Establecimiento de la VCL y formación del poro en el macrófago
Pfr	Reductasa Férrica periplásmica	Adquisición de Fe^{+2}

La OM es la característica distintiva de todas las bacterias Gram-negativas. Es una bicapa lipídica compuesta de fosfolípidos, lipoproteínas, LPS y proteínas. Los fosfolípidos se encuentran principalmente en la parte interior de la OM, como son las lipoproteínas que conectan la membrana externa al peptidoglicano del periplasma. Es en la membrana externa la ubicación de las moléculas de LPS maduros y de las Vesículas de Membrana Externa (OMV´s), así como de otros factores que se muestran en el **Cuadro 4.**[23]

También se encuentra el sistema de secreción tipo IV el cual consta de 23 genes conocidos como Dot/Icm, que pueden engañar a las células eucariontes en el transporte al Retículo Endoplásmico (RE); estos genes de virulencia que significan: tráfico defectuoso de organelos (defective organelle trafficking: Dot) y multiplicación intracelular (Intracellular multiplication: icm), ambos promueven la infección intracelular por varias vías. Primero incrementa la entrada de *Legionella pneumophila* a la célula huésped, segundo, es

esencial para mantener la capacidad de *Legionella* de inhibir la fusión lisosómica/ fagoendolisosómica y establecer su nicho replicativo. [25]

Finalmente el sistema Dot/icm es importante para la apoptosis y la regresión de la célula huésped. Las proteínas efectoras secretadas por el sistema IV son especialmente responsables de alterar la fusión de la célula huésped, uno de tales efectores es la denominada proteína RalF, que actúa como una proteína de huésped (ARF1) y está implicada en la circulación vesicular entre el RE y el aparato de Golgi. Al menos 275 efectores han sido identificados con múltiples objetivos y superpuestas funciones de las células del huésped incluyendo actividad de la GTPasa de las células del hospedero, metabolismo de los fosfoinositidos, secreción proteica, apoptosis, traslación de proteínas eucarióticas, ubiquitinación, y funciones mitocondriales. Variaciones mutagénicas en el sistema Dot/icm conducen a la perdida de la virulencia. [14, 26]

Cuadro 4. Proteínas de Membrana Externa asociadas a la virulencia [23]

Proteína	Función Molecular	Rol en la Virulencia
Pili tipo IV y Flagelos		Movilidad y adhesión a macrófagos.
DotD, DotC, IcmN	Maquinaria Genética	Supervivencia Intracelular
PlaB	Fosfolipasa A/ Lisofosfolipasa A	Contacto dependiente, actividad hemolítica y juega un papel importante en la infección en puercos de guinea
MOMP	Porina	Fijación a célula hospedero.
Hsp60	Proteína de choque térmico	Fijación e invasión a células HeLa
Mip	Peptidil- Propil cis/ trans isomerasa	Eficiente replicación dentro de la célula hospedero y transmigración cruzando la barrera epitelial de modelos in vitro de pulmón.
Lcl	Proteína tipo colágeno	Adherencia e invasión de la célula hospedero.

También se ubican los Pili tipo IV que potencian la adhesión de las bacterias a los macrófagos y células epiteliales, los flagelos favorecen la invasión de forma independiente a la adherencia. La proteína principal de la membrana externa es una porina que también funciona como un lugar de ensamblaje para los componentes del complemento y por tanto, interviene en la opsonofagocitosis. La Mip es un peptidilpropil isomerasa de superficie de 24 kDa, necesaria en las etapas iniciales de la infección para una óptima

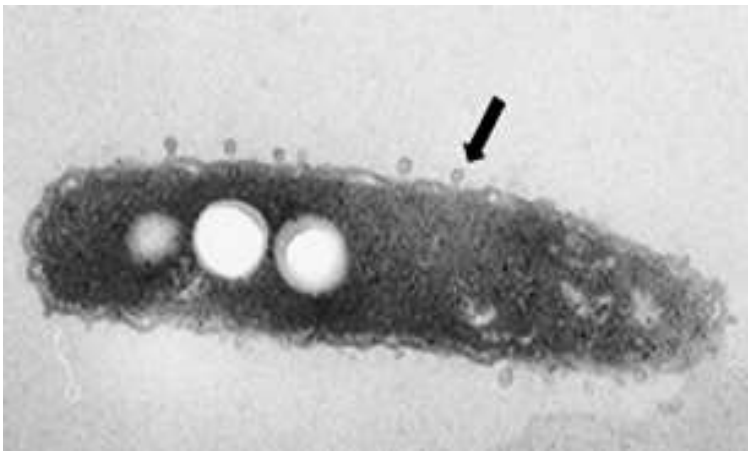


Figura 8.- Micrografía electrónica de *Legionella pneumophila* donde se muestran las OMP´s (flecha) cuando está en crecimiento en un medio líquido. [23]

infección intracelular, además inhibe la acción de la Proteinquinasa C y necesaria para una completa virulencia en ciertos animales. Por otro lado la proteína de choque térmico Hsp60 ha demostrado que incrementa la invasión de las células epiteliales y de cultivos celulares tipo HeLa. [14,23]

Otros factores como el gen rtxA potencian la adherencia y la virulencia, aunque la localización y la estructura de este producto proteico no están claro. El gen rcp, que parece codificar la enzima modificadora del lípido A, confiere la resistencia a los péptidos catiónicos y promueve la infección de los macrófagos y el pulmón. [14, 20]

Las vesículas de membrana externa (OMV´s), las cuales son desprendidas como su nombre lo indica de la membrana externa de la pared celular, lo hacen en mayor cantidad que otras bacterias gramnegativas, estas miden entre 100 y 250 nm de diámetro, entre sus principales componentes es la membrana externa con LPS y parte del periplasma como se observa esquemáticamente en la **Figura 7**, y en una micrografía real en la **Figura 8** donde se pueden observar estas vesículas señaladas con una flecha. La OMV´s de *Legionella* contiene desproporcionadamente un gran número de proteínas asociadas a la virulencia, y también muestran actividad lipolítica y proteolítica. El control de la formación de biofilms o biopelículas y otras funciones que han sido asignadas a las OMV´s, las cuales también pueden liberar toxinas y otros factores de virulencia y ha mostrado adherirse a la superficie de las células huésped. Además la respuesta inmune como perfiles de citosinas, inflamación e inmunidad innata es modificada por contacto de las OMV´s de la bacteria. [23]

Las investigaciones llevaron a la conclusión de que *Legionella pneumophila* emplea las OMV´s para el transporte de factores de virulencia hacia el entorno donde se encuentre, sin embargo el modo exacto en el que interactúan las OMV´s y la superficie de células huésped no está muy claro, además de que también pueden provocar una respuesta

inmune de las células del epitelio alveolar, resultando en la relación de IL-6, 7, 8 y 13, también IFN-γ y MCP-1, la inhibición de la fusión entre fagosomas y lisosomas, como ya se mencionó estas también muestran actividad lipolítica y proteolítica, en este sentido las OMV´s podrían contribuir a la diseminación de la infección cruzando las barreras tisulares tales como el epitelio alveolar. [23]

1.4.1 Vías de asimilación del Hierro

Varios laboratorios han demostrado en sus investigaciones la importancia del hierro para *Legionella*, estudios anteriores indicaban que los requerimientos de hierro es la llave para el éxito de la replicación intracelular, la infección extracelular y la virulencia de *Legionella*. En efecto el medio de cultivo estándar para el aislamiento de *Legionella* es notable por su contenido y agregado del hierro. [11]

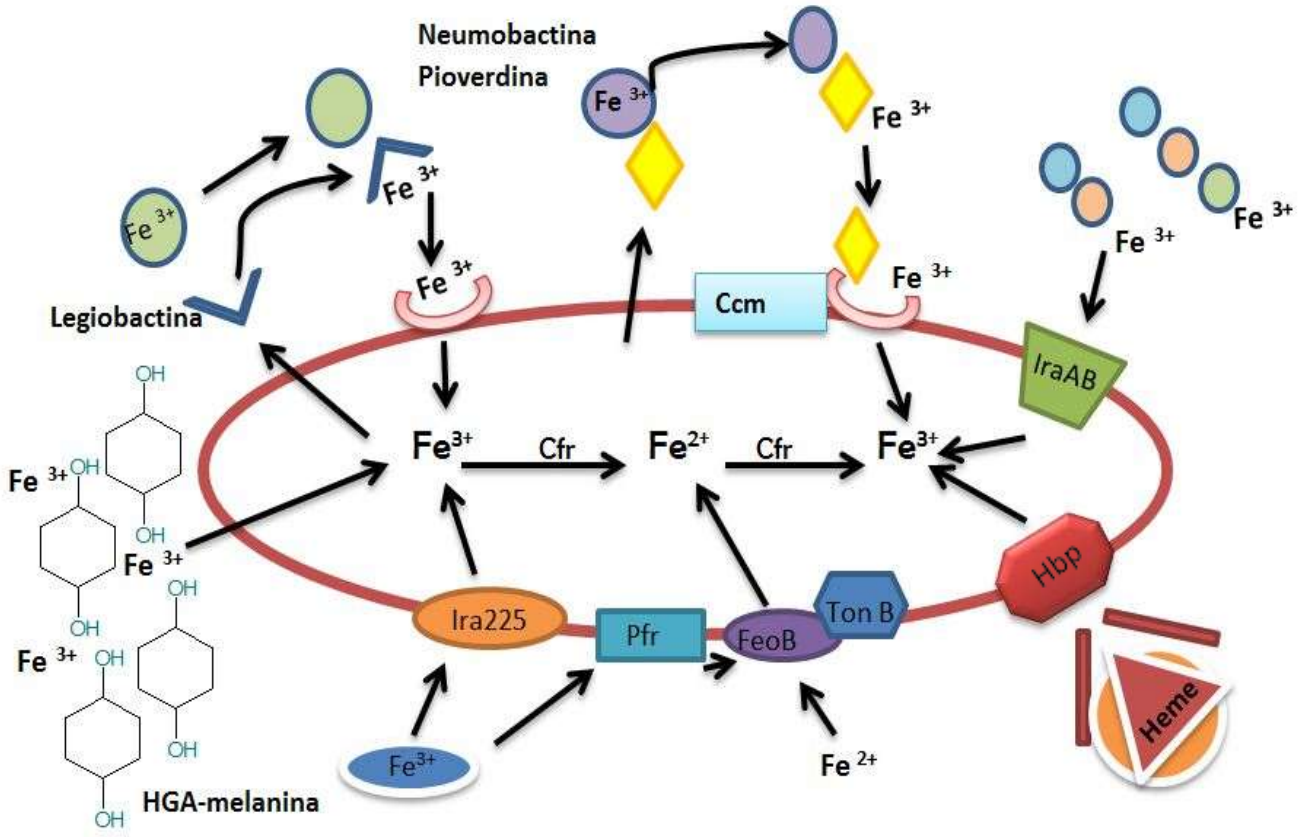


Figura 9.- Vías potenciales de asimilación de Hierro por *Legionella pneumophila*, Ccm: Complejos requeridos para asimilación del hierro, IraAB: Péptido transportador de hierro, Hbp: Proteína transportadora del grupo Heme, TonB/FeoB: Transportador del ion Ferroso Pfr: Reductasa periplásmica férrica, Cfr: Reductasa férrica citoplásmica, Ira225: Para absorción del hierro. HGA: Ácido homogentísico[11]

De manera similar se han hecho aislamientos de *Legionella* de sistemas de agua que contienen niveles elevados de hierro. Se han realizado tres pruebas para demostrar que la capacidad de *Legionella* para replicarse dentro de las células depende del hierro: la primera en monocitos y macrófagos tratados con quelantes del hierro como desferrioxamina, apotransferrina y apolactoferrina no hubo replicación, el segundo, la citosina Interferón-γ inhibió el crecimiento bacteriano por reducción de la cantidad de hierro en la célula huésped, y el tercero, los macrófagos llegan a ser permisivos a la infección intracelular seguido de la adición del hierro.[11]

Adicionalmente tres aspectos importantes de la importancia de la adquisición del hierro para efectuar su virulencia, el primero, la introducción de suplementos de hierro a animales experimentales incremento la susceptibilidad de adquirir una infección por *Legionella*, el segundo, el crecimiento de *Legionella* en condiciones de baja concentración de hierro exhibe una reducida habilidad para causar enfermedad y tercero, una cepa no virulenta derivada del prolongado paso por una placa silvestre tiene un elevado requerimiento de hierro. [11]

Los requerimientos de hierro por parte de *Legionella* han sido aclarados y demostrados ampliamente, no así los mecanismos por el cual la bacteria adquiere este hierro, algunos de ellos es la capacidad de degradar la transferrina y usar el hierro liberado para su crecimiento, sin embargo esta forma de adquisición no es probable que promueva la infección intracelular. En resumen, se cree que *Legionella pneumophila* tiene múltiples vías de asimilación de hierro, que se muestran en la **Figura 9** donde también se muestra que el organismo puede producir un máximo de tres sideróforos, habiendo evidencia bioquímica de la legiobactina y datos genéticos de la existencia de quelantes de hierro de tipo hidroxamato y pioverdina. Los complejos Ccm asociados a la membrana son claramente requeridos para una óptima asimilación del hierro. En base a datos precedentes es posible que los productos del gen Ccm influencien en la producción de sideróforos. [11]

Se prevé que el locus iraAB codifica un péptido transportador de membrana el cual lleva su mismo nombre, sistema IraAB que promueve la adquisición de hierro por importación de cargas férricas de di o tripéptidos. *Legionella* también puede usar el hierro del grupo heme de la hemoglobina, en parte gracias a la acción de la proteína transportadora Hbp, pudiendo de esta manera obtener el hierro de las diversas proteínas contenedoras del grupo heme, no importando cual sea la fuente de hierro. [11]

La existencia en *Leginella pneumophila* de un gen feoB sugiere que el organismo tiene la capacidad de transportar el ion ferroso, esto es posible ya que uno de los nichos de estos

microrganismos es relativamente reducido, de tal manera que el ion ferroso sea prevalente. Por otro lado el FeoB de membrana interior también son permeasas que existen para asimilar el ion ferroso que ha sido generado en el periplasma por la reducción del ion férrico adquirido. Para que lo anterior suceda *Legionella pneumophila* posee una reductasa periplásmica férrica (Pfr), sin embargo también cuenta con una reductasa férrica citoplásmica (Cfr) lo que sugiere que no toda la reducción del hierro ocurre en el periplasma. Estudios genéticos han sugerido la existencia de varias vías de absorción del hierro como el Ira225. También se ha observado la formación de un complejo: HGA-melanina (ácido homogentísico-melanina), el pigmento evidente en *Legionella pneumophila* de la fase estacionaria flotante que es hierro dependiente, esta observación además de comprobar que la melanina retiene el hierro, también sugiere que este pigmento generado por *Legionella* es un depósito para el exceso de hierro.[11]

1.4.2 Replicación Intracelular

Como ya se ha mencionado con anterioridad, las legionelas son parásitos intracelulares facultativos que se pueden multiplicar en: macrófagos alveolares, monocitos y en amebas de vida libre. El ciclo comienza con la unión del complemento a una proteína porina de la membrana externa y el depósito del componente de complemento C3b en la superficie bacteriana. Esto permite la unión de las bacterias a los receptores CR1 y CR3 del complemento de los fagocitos mononucleares, después de lo cual los microrganismos entran en los mismos mediante un proceso de endocitosis. Las bacterias no mueren en las células por exposición al superóxido tóxico, peróxido de hidrógeno o radicales hidroxilo, como sucediera normalmente con otras bacterias como se ilustra en la **Figura 10**, esto como consecuencia de la inhibición de la unión de los fagolisosomas, y por el contrario en las vacuolas las bacterias continúan replicándose. [1, 11, 14]

El endosoma que contiene *Legionella* también llamadas Vesículas que contiene a *Legionella* (VCL) recluta Vesículas secretoras del Retículo Endoplásmico Rugoso (VRE), las VCL toman propiedades del Retículo ER, este ciclo de replicación se ilustra en la **Figura 11.** *Legionella pneumophila* parece lograr este control del fagocito mediante sus sistemas de secreción de proteínas principalmente el Dot/Icm Tipo IV, capaces de modular el tráfico de vesículas de la célula hospedadora y evitar el transporte de los lisosomas. Otros elementos del éxito intracelular del microrganismo incluyen su capacidad para extraer hierro de la transferrina y la producción de una toxina peptídica que inhibe la activación de los mecanismos de destrucción oxidativa empleados por los fagocitos, *Legionella pneumophila* se logra multiplicar con libertad. La inducción de la apoptosis y la formación de una toxina formadora de poros finalmente conducen a la muerte del macrófago. La lisis

de los macrófagos libera una nueva población de células de *Legionella*, que repiten el ciclo infeccioso. [1, 16, 24]

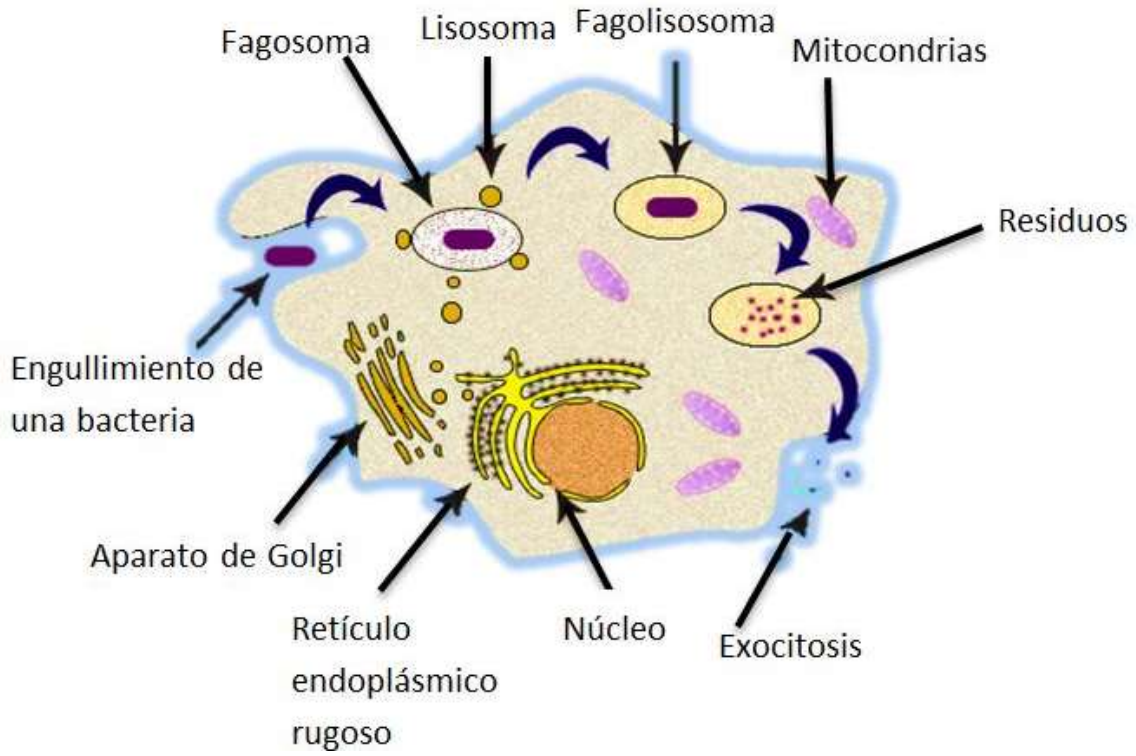


Figura 10.-Se observa el proceso normal de la fagocitosis en la cual el producto final es la destrucción del microorganismo fagocitado.[27]

Este ciclo puede repetirse en los alveolos adyacentes lo que conduce a una amplificación de la infección como se observa en la micrografía de la **Figura 12**. Las células diana, como consecuencia de su estimulación por las legionelas, liberan citosinas capaces de atraer a otras células inflamatorias hacia los focos de infección. El daño de los tejidos puede ser atribuido a los productos bacterianos tóxicos (legiolisina, proteasas, DNAsas, endotoxina) o bien a sustancias liberadas por los propios leucocitos. En la mayoría de los casos se produce una bronconeumonía confluente que progresa hacia una neumonía lobular. La infección puede difundir habiéndose demostrado focos de infección en riñones, bazo, médula ósea, hígado, miocardio y cerebro. [28]

El estado fisiológico de *Legionella* es importante para determinar su virulencia, ya que ésta se incrementa cuando el microrganismo se multiplica en el interior de las amebas y en la fase estacionaria tardía *in vitro*. *Legionella pneumophila* tiene 2 estadios:

1.- Fase replicativa intracelular (FR)
2.- Fase transmisora no replicativa o infecciosa (FT), o forma quística.

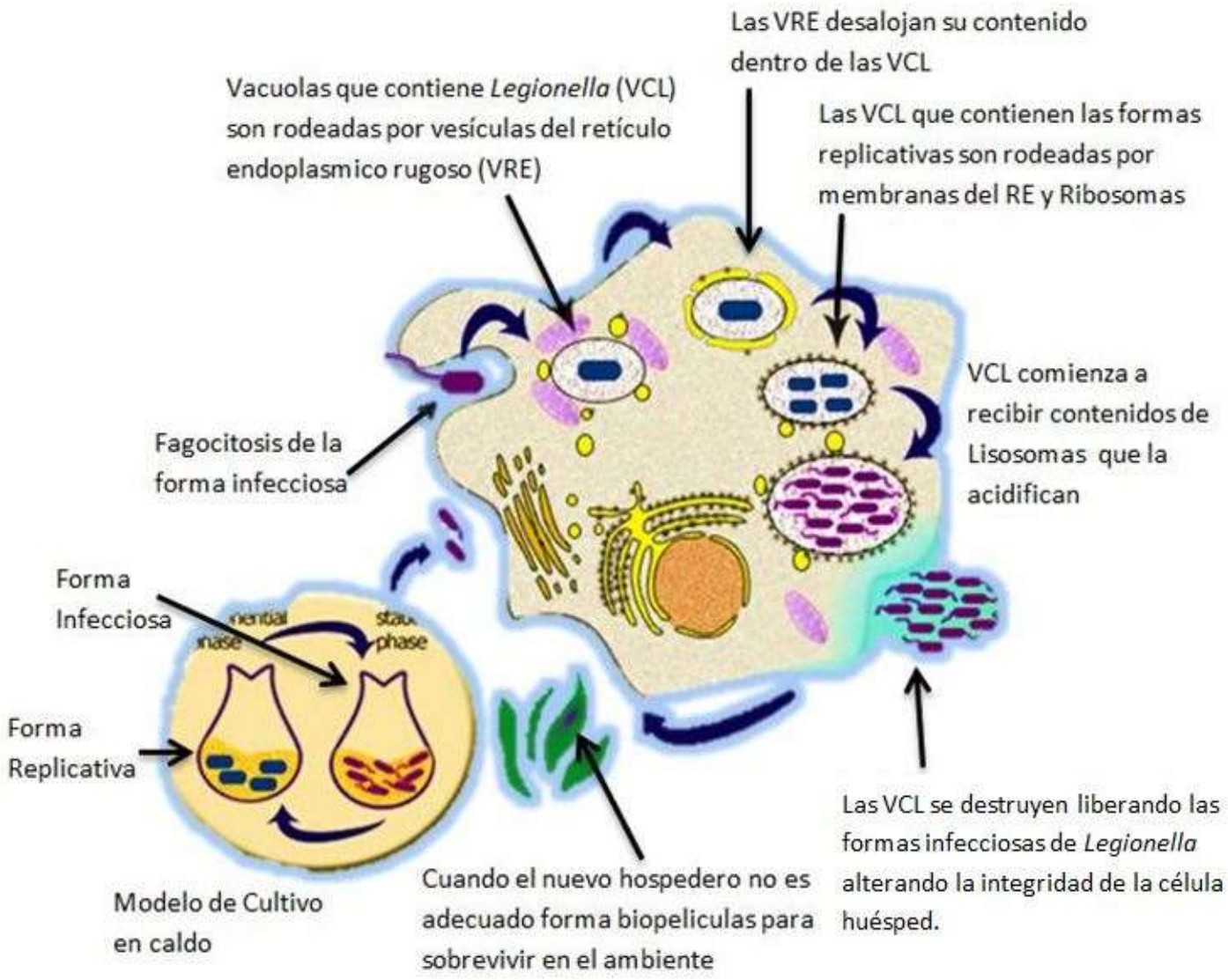


Figura 11.- Se ilustra el proceso llevado a cabo cuando *Legionella* es fagocitada, se observa que se replica dentro del macrófago expulsando la progenie que seguirá infectando a otras células o formara biopelículas si es expuesto al ambiente.[27]

En la FT son avirulentas, no flageladas, y resistentes a los antibióticos ya las lisis mediada por detergentes, es una forma altamente infecciosa, donde el microrganismo tiene un metabolismo inactivo y puede estar protegido por la biopelícula protegiéndola también del frío, el calor y los desinfectantes como el cloro principalmente. Mientras que en la FR son virulentas, flageladas, y móviles, ultra estructuralmente es similar a las bacterias que

desarrollan en el agar. Un sistema complejo regulatorio es el que rige la diferenciación entre estas dos fases. En la FT la bacteria tiene una expresión genética concerniente con la transmisión y el ataque a las células del hospedero, así como substratos del sistema de secreción Dot/icm tipo IV y más de 90 proteínas, mientras que en la FR sólo expresa componentes de metabolismo aeróbico, por lo que este sistema regulatorio no solo controla la virulencia si no también la motilidad. [14, 16, 24, 25]

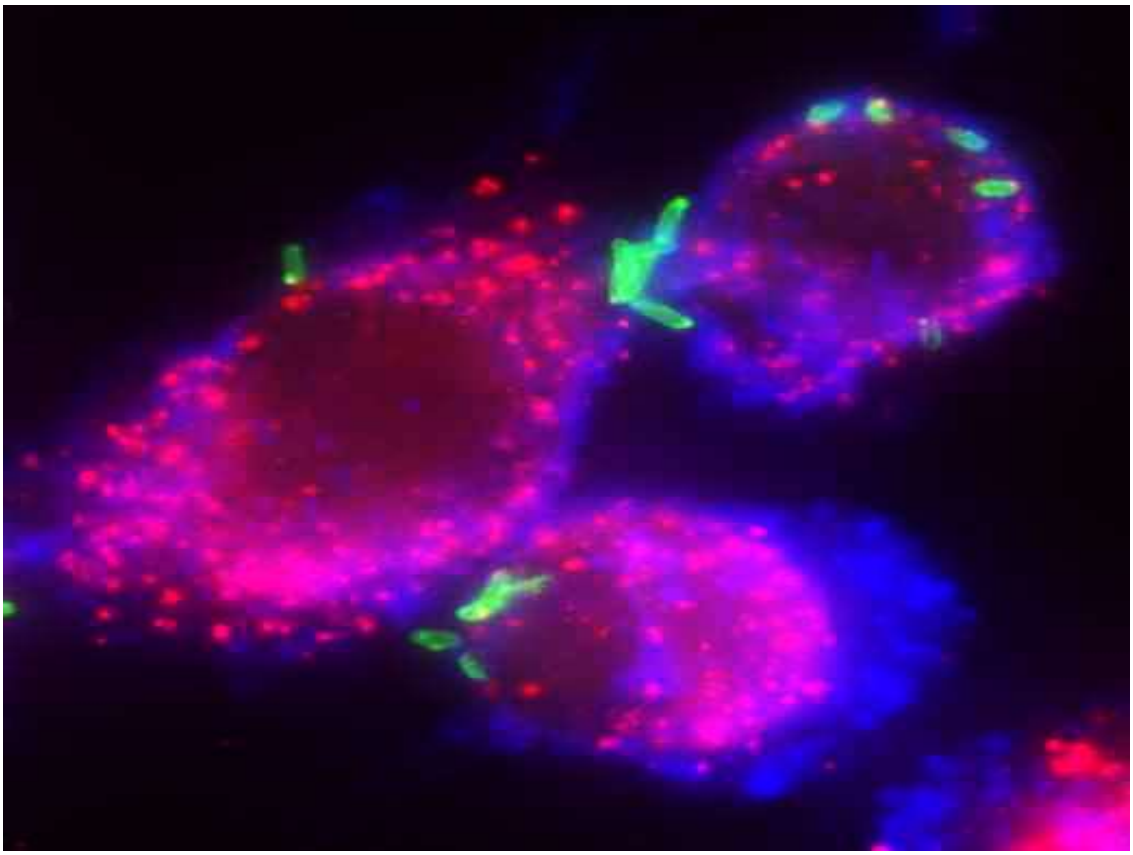


Figura 12.-Se observan a macrófagos con *Legionella pneumophila* (color verde) siendo fagocitadas, observándose en algunos la multiplicación interna de la bacteria.[19]

1.5 Factores de inmunidad

Como ya se ha mencionado *Legionella pneumophila* es un patógeno intracelular que se replica dentro de los macrófagos alveolares, sin embargo la resolución de la infección en el pulmón requiere múltiples tipos de células y un abundante cruce entre células inmunológicas.[29]

El control inmunológico de la infección está mediado por el sistema inmunitario celular, y es el que parece ser el mecanismo de defensa principal del huésped frente a esta infección. La respuesta de linfocitos T colaboradores (Th1), y sus citosinas asociadas, es particularmente importante para el combate de la *Legionella*. La activación del IFN-γ hace que los macrófagos impidan el crecimiento de *Legionella pneumophila*. Este cambio en la permisividad del huésped implica entre otros, una reducción en el hierro intracelular, un factor necesario para la replicación y crecimiento intracelular. Se producen anticuerpos durante la infección por *Legionella pneumophila*, pero la respuesta humoral no parece decisiva en la defensa del huésped. [14]

Las células dendríticas representan un grupo heterogéneo de células con propiedades funcionales especializadas, las células dendríticas juegan un rol crítico en la obtención de la respuesta inmunitaria adaptativa a través de su papel como células primarias de presentación del antígeno. Estudios recientes han mostrado que las células dendríticas plasmocitoides (pDC) realizan una importante contribución a la restricción de la infección de *Legionella in vivo*. La pDC es conocida por su habilidad a combatir infecciones virales a través de la producción de IFN-I, sin embargo el rol de la pDC en la resistencia a la infección bacteriana no había sido bien descrito. Durante la infección por *Legionella* las pDC son rápidamente reclutadas a los pulmones y en el agotamiento de la pDC hay un incremento significante y una sobrecarga microbiana en el pulmón. [26]

El mecanismo que recluta las pDC a el pulmón todavía no se conoce, pero es el sitio primario de replicación de *Legionella pneumophila*, sin embargo el número de bacterias presentes en estas células es significativamente menor comparado con el de los macrófagos. Los macrófagos son un tipo de fuente de quimioatracción con citosinas, las pDC presumiblemente después de responder a la infección por *Legionella pneumophila,* hay una producción de citosinas que activan neutrófilos, células NK y macrófagos para matar las bacterias intracelulares. Lo anterior se puede ver esquematizado en la **Figura 13.** [26]

La inmunidad humoral tiene solo un papel limitado en la defensa del hospedero contra *Legionella pneumophila*, los organismos son resistentes a la actividad lítica del complemento incluso en presencia de Ac, y de los PMN en presencia de suero y Ac. De hecho, al estimular la fagocitosis por los monocitos, los Ac pueden favorecer la infección, ya que los organismos pueden multiplicarse más fácilmente dentro del fagosoma que extracelularmente. Los macrófagos alveolares activados inhiben la multiplicación de los organismos.[30]

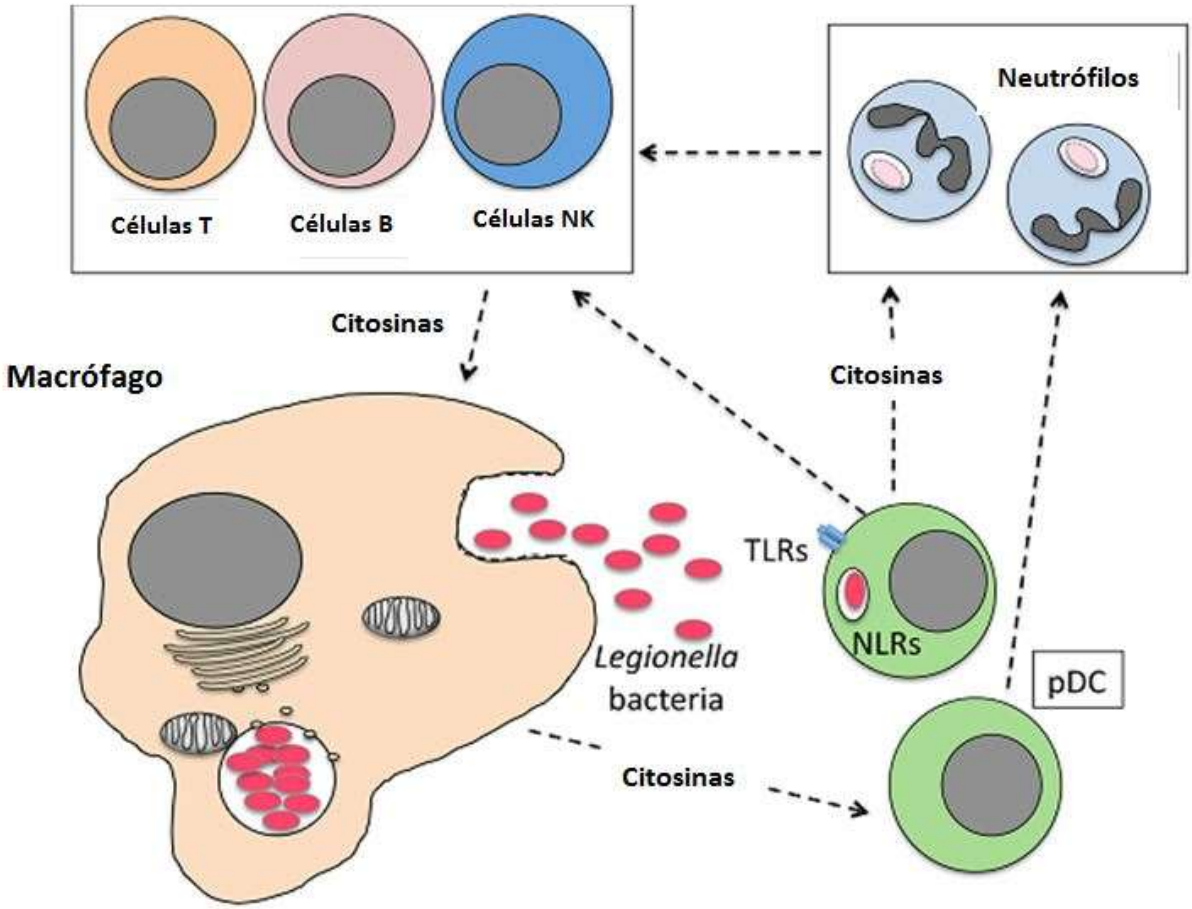


Figura 13.- Modelo del rol de la pDC en combate a *Legionella pneumophila* en una infección pulmonar. *L. pneumophila* infecta a los macrófagos produciendo citosinas y quimiocinas que reclutan pDC al pulmón. La bacteria activa a las pDC vía interacción TLR/NLR o por citosinas de los macrófagos infectados, habiendo así la producción de citosinas de pDC que activan células NK, y Linfocitos T y B que eliminan la bacteria directa o indirectamente.[26]

De la misma forma en que la multiplicación intracelular es la clave de la virulencia de *Legionella pneumophila,* la detección de su proliferación por mecanismos de inmunidad innata y adaptativa es el aspecto de la inmunidad, la activación pronta de células inmunes es crítico para el inicio de la respuesta inmune adaptativa. Este alto nivel de inmunidad innata contra la infección por *Legionella* y otros microrganismos se relaciona con un patrón de respuesta de reconocimiento rápido desencadenado por receptores principalmente en macrófagos y células dendríticas las cuales son importantes centinelas del sistema inmunológico detectando agentes infecciosos por un sensor altamente conservado, llamado: Patrones Moleculares de Asociación Patógena (PMAP´s o PAMP´s por sus siglas en ingles), estos patrones son mediados por un set de invariables Patrones

de Receptores de Reconocimiento (PRR´s), de los cuales se han identificado 4 tipos principales: [1, 26, 31]

1. Receptores tipo Peaje o tipo toll (TLR´s),
2. Receptores de tipo Gen-I inducible de Ácido Retinoico (RLR-I),
3. Receptores de tipo Lectina-C (CLR´s)
4. Receptor de tipo atador de nucleótidos y de dominio de oligomerización (NOD o NLR´s)

Gracias a *Legionella* se pudo elucidar este proceso el cual se basa principalmente en el reconocimiento de patógenos asociados a los PAMP´s y el uso del set de los PRR´s, entre estos PAMP´s se encuentran moléculas como LPS, peptidoglicano, lipoproteínas bacterianas y flagelina para el caso de *Legionella*, así como ácidos nucleicos derivados de bacterias, virus, hongos y protozoarios. A partir del reconocimiento de un determinado ligando como los ya mencionados, ya sea directa o indirectamente son los TLR´s quienes dimerizan y disparan una actividad de cascada de señalización que conducen a la activación de la cascada proinflamatoria. [29]

Los TLR´s son proteínas transmembranales que traen un enriquecimiento por repetición de leucinas, dominio que facilita el reconocimiento del PAMP y un dominio que hace una señalización intracelular que se media a través de 4 proteínas adaptadoras:

1. Tranvía
2. Mal/TIRAP
3. MyD88
4. TRIF

Estos TLR´s están incrustados en la membrana o bien extracelularmente (TLR-1, -2, -4, -5, -6, -10, -11) o en las membranas de las vacuolas endocíticas (TLR-3, -7, -8, -9). [29]

En la **Figura 14** se observa la respuesta de inmunidad innata de un fagocito infectado con *L. pneumophila*, este esquema representa parte de los expuesto anteriormente como las vías activadas en el fagocito después de la infección con *L pneumophila*. Los recuadros rojos indican a *L pneumophila* asociada a patrones moleculares importantes para la activación de los PRR´S. Los recuadros azules indican moléculas o procesos involucrados en la restricción celular autónoma de *L pneumophila.* [29]

Los tipo NLR's comprenden un gran familia de PRR´s citoplasmáticos de los cuales solo algunos miembros han sido caracterizados a detalle (NOD 1 y NOD 2 principalmente). Algunos NLR´s forman complejos multiproteicos llamados "Inflamasonas" y la activación de estos complejos conduce a la escisión del efector molecular central Cisteína-Proteasa:

caspasa 1, induciendo a una forma de muerte celular conocida como "piropoptosis" la cual es acompañada por la relación de pirógenos IL-1β, IL-18, e IL-33. [26]

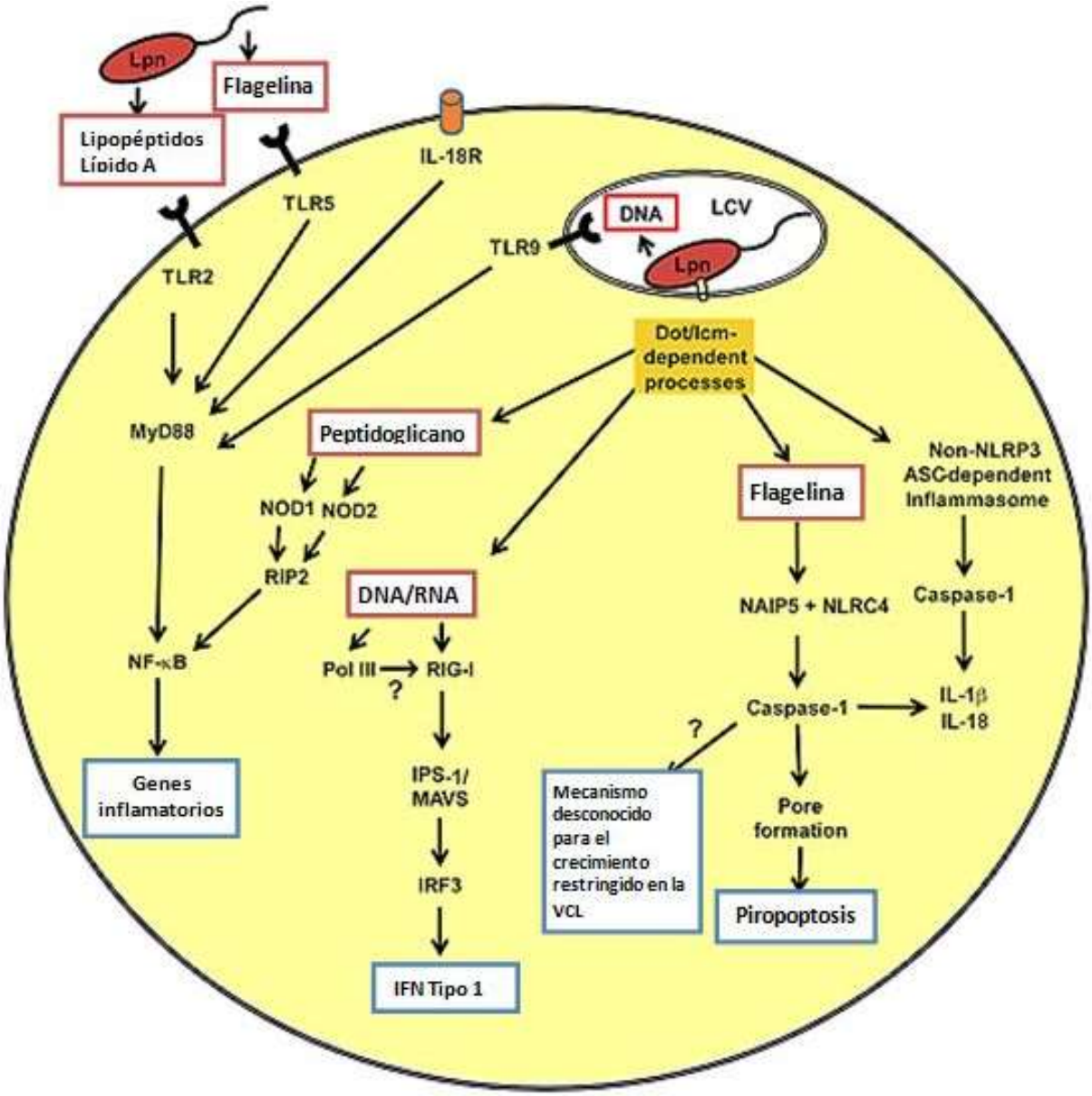


Figura 14.- Modelo de respuesta de inmunidad innata de un fagocito de mamífero después de la infección con *Legionella pneumophila*. Los rectángulos rojos indican una asociación molecular de *L. pneumophila* con patrones importantes para la activación de receptores del patrón de reconocimiento, mientras que los rectángulos azules indican moléculas o procesos involucrados en la restricción celular autónoma de la replicación de *L. pneumophila*.[29]

La flagelina se detecta y la Nlrc4 inflamasoma juega un papel importante en la detección de *L pneumophila,* la presencia de la flagelina bacteriana en el citosol de la célula huésped y el reconocimiento del C terminal de esta flagelina, es suficiente para la activación de la Nlrc4 inflamasoma, interesantemente la localización de la flagelina en el citosol y/o la restricción de la replicación son dependientes del sistema de secreción Dot/Icm tipo IV, sin embargo no está bien conocido como este sistema contribuye a la translocación de la flagelina dentro del citosol del huésped y si la detección de la flagelina por la inflamasoma ocurre directamente o indirectamente con la ayuda de cofactores. [26, 31]

Si bien la formación de la inflamasoma conduce a la activación de la caspasa 1, así como maduración y secreción de IL-1β y IL-18, ni una citosina hace una mayor contribución a la restricción de *L pneumophila in vitro o in vivo*. No obstante pruebas en ratones han demostrado que la caspasa 1 deja a los macrófagos más susceptibles a la replicación, mientras que los deficientes de caspasa 1 son más susceptibles a la infección. [26]

En el modelo experimental de legionelosis en ratones A/J, las quimosinas proinflamatorias relevantes y citosinas incluyen el factor quimiotáctico de neutrófilos inducido por citosinas (KC), la proteína inflamatoria macrofágica (MIP-2), el factor de necrosis tumoral (TNF-α), la IL-12 y 18, así como el IFN-γ. [14]

Resumiendo todo lo anterior los TLR's, NLR's y RLRs, reconocen efectivamente a *L. pneumophila*, esto conduce a varios eventos importantes por el resultado de la infección: [29]

1. Los fagocitos activan células autónomas y mecanismos para restringir la replicación bacteriana
2. Los fagocitos desencadenan la expresión de cientos de genes inflamatorios, incluyendo los de citosinas y quimosinas
3. Los fagocitos a continuación expresan un estimulador y moléculas co-estimuladoras importantes para la presentación de antígeno
4. Las citosinas y quimosinas secretadas reclutan células T adicionales para él sitio de la infección
5. Con la presentación de antígenos el sistema inmune procederá a generar respuestas que son altamente protectoras contra la reinfección.

1.6 Legionelas de importancia médica

Se han identificado al menos 42 especies de *Legionella*, incluyendo 15 serogrupos de *Legionella pneumophila*, de estas al menos 20 especies son patógenos humanos, las más frecuentes tras *L. pneumophila* son *L. micdadei* (agente de la neumonía de Pitsburg y la segunda en frecuencia), *L. bozemanii, L. dumoffi y L. longebeachae* entre muchas otras que se mencionan en el **Cuadro 5** mientras que en la **Figura 15** se muestra el % de incidencia de las principales especies de *Legionella*. Estudios de aislamientos clínicos y ambientales usando sondas de ADN demuestran que nuevas especies están aún por identificar. [32]

Como ya se había mencionado con anterioridad la Familia *Legionellaceae*, se dividió en 3 géneros: *Legionella, Tatlockia, y Fluoribacter*, sin embargo estos dos últimos no se han usado ni aceptado ampliamente y se emplea el género *Legionella* para nombrar universalmente a todas las especies, ya que el género *Legionella* es el más importante y el único que se encuentra en seres humanos.[14]

Cuadro 5. Legionelas de importancia médica [7, 18, 32]

Especie	Serogrupos	Especie	Serogrupos
L. pneumophila *	14	*L. feeleii***	2
*L. micdadei**	1	*L. birminghamensis*	1
*L. longbeache**	2	*L. cincinnatiensis*	1
*L. wadsworthii**	1	*L. jordanis**	1
L. hackeliae	2	*L. gormanii* (Tatlockia gormanii)*	1
L. maceachernii	1	*L. dumoffi* (T dumoffi)*	1
*L. oakridgensis**	1	*L. bozemanii* (T bozemanii)**	2
L. paristensis	1	*L. micdadei* (Fluoribacter micdadei)**	1

*Causante de Neumonía, **Causante de Neumonía y casos de Fiebre de Pontiac

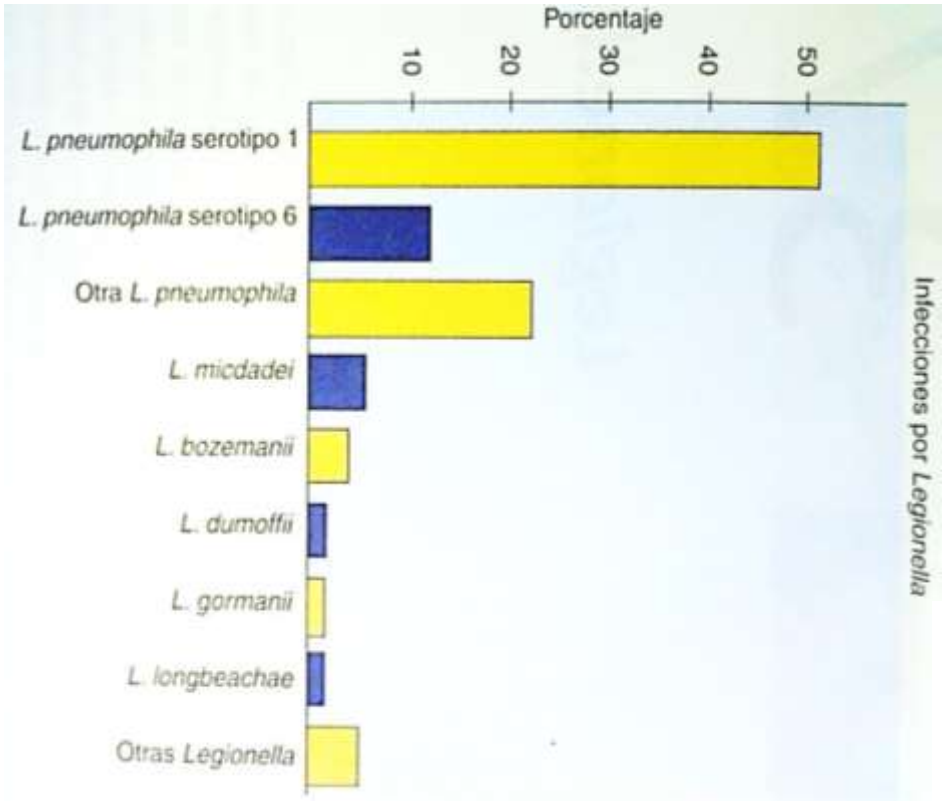


Figura 15.- Especies de *Legionella* asociadas a enfermedad en el ser Humano.[24]

1.7 Medios de cultivo

Las especies de *Legionella* son aerobias y exigentes nutricionalmente, estas bacterias requieren de L-cisteína y sales de hierro para su desarrollo sustancias que están presentes en el medio BCYE: (buffered charcoal yeast extract) hasta un pH de 6.9. Este medio de cultivo contiene carbón vegetal para destoxificar el medio, eliminar el CO_2, y modificar la tensión superficial permitiendo así una proliferación más fácil de los microrganismos, así como extracto de levadura y α-cetoglutarato como fuentes de L-cisteína. [4, 15, 22, 33]

La L-cisteína representa un ingrediente esencial para el cultivo, mientras que la presencia conjunta de cetoácidos e iones férricos promueve el desarrollo de las legionelas. Los ingredientes activos del extracto de levadura serían los derivados de la purina y la pirimidina, de los cuales el más importante es la guanina. El carbón activado absorbe y destoxifica los ácidos grasos y los radicales oxigenados además de prevenir la oxidación de la L-cisteína. El agregado del ácido α-cetoglutárico al extracto de levadura con carbón promueve el desarrollo de las legionelas, tal vez a través de la estimulación de la producción de enzimas recolectoras de productos oxigenados. [9]

Cuadro 6. Fórmula del Agar BCYE [34]	gramos
Extracto de Levadura……	10.0
Clorhidrato de L-cisteína……	0.4
Pirofosfato férrico……..	0.25
Tampón ACES……..	10.0
Carbón activado……	2.0
Alfa-cetoglutarato……..	1.0
Agar……..	15.0

Figura 16.- Modelo de Agar BCYE con cultivo de *Legionella pneumophila* [35]

Una de las características de las legionelas es su incapacidad para crecer en medios ordinarios de laboratorio, por lo que en principio hubo que recurrir a la inoculación animal para su aislamiento. El ensayo de múltiples medios de cultivo permitió a Weaver cultivar a *Legionella pneumophila* en agar Mueller Hinton suplementado con IsoVitalex al 1 % y hemoglobina al 1% (MH-IH) y más tarde estos dos ingredientes fueron sustituidos con L-cisteína y pirofosfato férrico respectivamente, obteniéndose así el primer medio de cultivo especializado denominado de Feeley-Gorman. [4, 7]

Posteriormente se le agrego el carbón activado y extracto de levadura pasando a ser el agar CYE, luego se le adicionó del amortiguador ACES (Ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetano sulfónico) y α-cetoglutarato para convertirse en el actual agar BCYE que constituye el mejor medio de cultivo, y se puede observar su formulación en el **Cuadro 6** su imagen en la **Figura 16**. Este medio de cultivo se vuelve más selectivo con el agregado de cefamandol, polimixina B y anisomicina (PAC), o en lugar de cefamandol vancomicina (PAV) o bien glicina, vancomicina, polimixina B y anisomicina (MWY) o en lugar de anisomicina agregado de cicloheximida (GVPC, fórmula en **cuadro 7** e imagen en la **Figura**

17). Los cuatro medios son utilizados para sembrar muestras clínicas y cada uno posee ventajas, sensibilidad y selectividad que le son propias de cada uno. [7, 14, 21, 27,]

Cuadro 7. Fórmula del Agar GVPC [36]	gramos
Extracto de levadura……	10.0
Carbón activado……	2.0
Agar Bacteriológico……	13.0
Tampón ACES……	10.0
KOH……	2.0
Alfa- cetoglutarato……	1.0
L-Cisteína……	0.40
Pirofosfato Férrico……	0.25
Polimixina B……	79200 UI
Glicina……	3.0
Cicloheximida……	0.08
Vancomicína……	0.01

Figura 17.- Modelo de Agar GVPC con cultivo de cepa ATCC de *Legionella pneumophila* [37]

El desarrollo en BCYE y la ausencia de desarrollo en Agar Sangre es uno de los hallazgos presuntivos que más orientan hacia la posible presencia de *Legionella*, pero otro microrganismo que crece den BCYE y no en agar sangre ordinario es *Francisella tularensis*, pero a diferencia de las especies de *Francisella* que producen ácido a partir de carbohidratos, las especies de *Legionella* no oxidan ni fermentan los carbohidratos. [4]

Así mismo otras bacterias que pueden desarrollar en BCYE son bacilos formadores de esporas termófilos, y *Bordetella perstusis*, pero la diferencia entre estas bacterias y las especies de *Legionella* se basa en las características morfológicas, serológicas y de la composición celular de ácidos grasos [4]

Capítulo 2 Agentes Causales de Neumonía

Legionella pneumophila es notable por su propensión para atacar el pulmón, es decir es el órgano blanco de la bacteria, por ello la importancia de conocer y reafirmar como están conformados anatómicamente los pulmones para ubicar mejor las entidades especificas del ataque bacteriano y poner en contexto a *Legionella pneumophila* en comparación con otras bacterias que también afectan el sistema respiratorio, así como la clasificación en la que se encuentra.[1]

2.1 Anatomía del Sistema Respiratorio.

El sistema respiratorio, se encuentra anatómicamente dividido en 2 partes, el tracto respiratorio superior comprendido desde las fosas nasales a la laringe, y el tracto respiratorio inferior comprendido principalmente por la tráquea y los pulmones. Como se observa en la **Figura 18** donde se muestra la anatomía del tracto respiratorio inferior que para los fines de este manual es de mayor relevancia.[33]

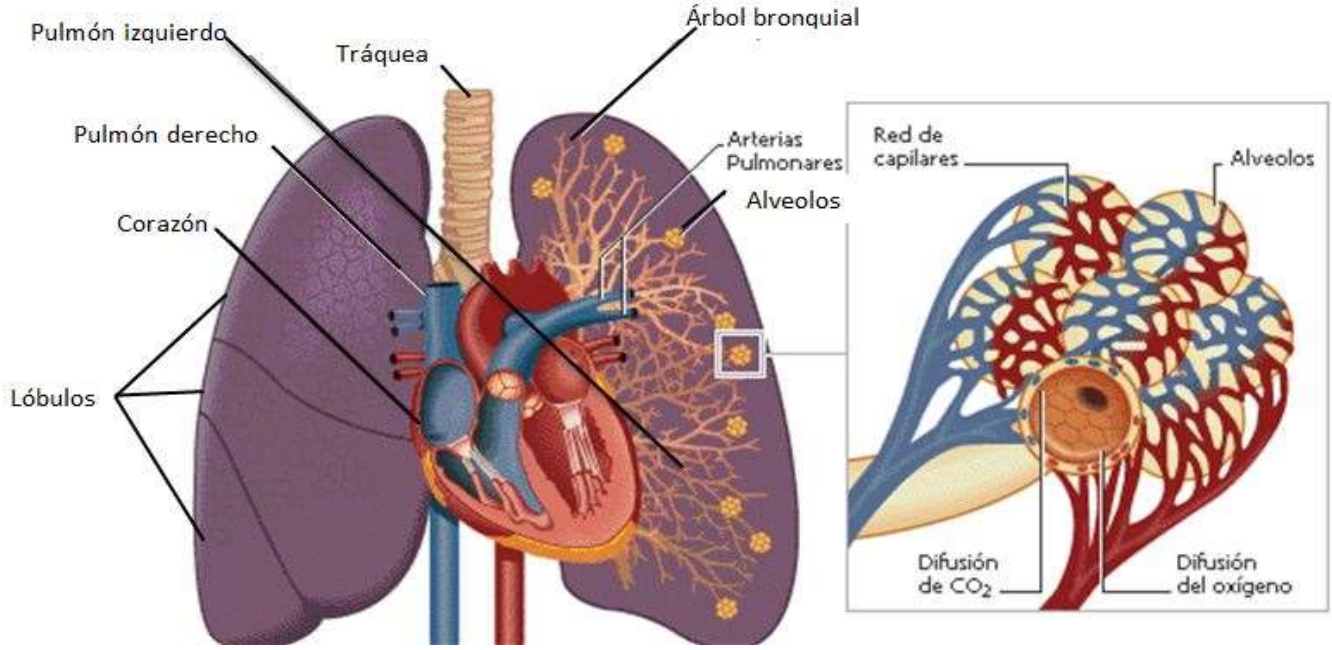


Figura 18.- Anatomía del tracto respiratorio inferior [38]

Anatómicamente los pulmones son diferentes, mientras que el pulmón derecho tiene tres lóbulos, el pulmón izquierdo sólo tiene dos, con un hueco central para acomodar el corazón. Las dos ramificaciones de la tráquea, llamadas bronquios, se subdividen dentro de los lóbulos en otros más pequeños llamados bronquios secundarios y éstos a su vez en conductos aéreos aún más pequeños que son los bronquios terciarios. Terminan en minúsculos saquitos de aire llamados alveolos, rodeados de capilares. Cuando los alveolos se llenan con el aire inhalado, el oxígeno se difunde hacia la sangre de los capilares, que es bombeada por el corazón hasta los tejidos del cuerpo. El dióxido de carbono se difunde desde la sangre a los pulmones, desde donde es exhalado.[33]

2.2 Clasificaciones de la Neumonía

La neumonía es un proceso infeccioso del tejido pulmonar producido por la proliferación de microorganismos en el interior de los alveolos, tal y como lo hace *Legionella pneumophila*, produciendo una respuesta inflamatoria en los bronquiolos y en los sacos alveolares finos. Por ello la importancia de mencionar la clasificación de las neumonías para ubicar mejor a la causada por *Legionella*. La neumonía puede ser una enfermedad grave, especialmente entre los ancianos, niños y los inmunodeprimidos. La neumonía es una inflamación del pulmón causada por bacterias, virus, hongos u otros microorganismos. Estos microorganismos hacen que los pequeños sacos de aire de los pulmones se llenen de líquido producido por el tejido inflamatorio, en este caso la neumonía causada se denomina como Legionelosis. [39, 40]

La Neumonía significa entonces infección del tejido pulmonar, hay más de 60 causas y tipos diferentes que pueden clasificar a la neumonía de muchas maneras, tres son las formas generales de clasificación: [33]

1. Anotómicamente: Por anatomía del pulmón: izquierdo, derecho, lóbulo superior o lóbulo inferior.
2. Microbiológicamente: según el microorganismo causal.
3. Clínicamente: Según la edad, el mecanismo de la neumopatía y la inmunidad.

La neumonía suele describirse como: [33]

a) Lobar: Afecta a un lóbulo pulmonar distintivo
b) Bronconeumonía: en parches difusa, que se difunde por todo el pulmón
c) Intersticial: Invasión del intersticio
d) Necrosante: cavitación y destrucción del parénquima con formación de abscesos.

En este caso por la naturaleza del manual se abordara la descripción de la neumonía microbiológica. Diversos agentes infecciosos como virus, bacterias y hongos causan neumonía, siendo los más comunes los siguientes: [40]

- *Streptococcus pneumoniae*: la causa más común de neumonía bacteriana en niños.
- *Haemophilus influenzae* de tipo b (Hib): la segunda causa más común de neumonía bacteriana
- El virus sincitial respiratorio es la causa más frecuente de neumomía vírica.
- *Pneumocystis jiroveci* es una causa importante de neumonía en niños menores de seis meses con VIH/SIDA, responsable de al menos uno de cada cuatro fallecimientos de lactantes seropositivos al VIH.

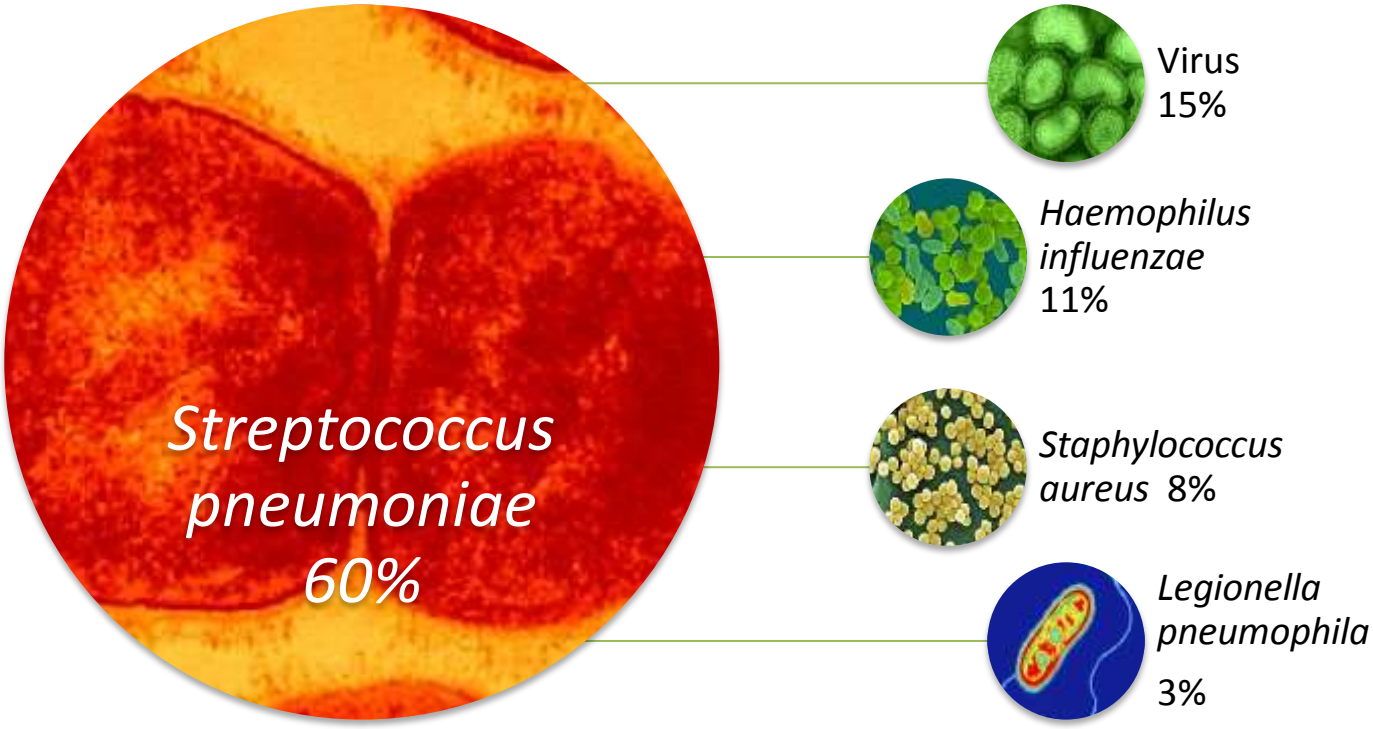


Figura 19.- Patógenos más comunes por incidencia aproximada en %, causantes de neumonía extra hospitalaria o típica en comparación con la causada por *L pneumophila* clasificada como agente causal de neumonía atípica [41]

En la **Figura 19** se observa un esquema de los principales agentes causales de Neumonía típica conforme a su % de incidencia en comparación con las causadas por *L pneumophila*. Cabe señalar que las neumonías virales se dan principalmente en niños, mientras que las de tipo bacteriano son más comunes en adultos. [41]

La Neumonía según el agente causal se suele subclasificar a menudo según el ámbito de adquisición, presuponiendo que se trata de pacientes sanos y se clasifican en dos:

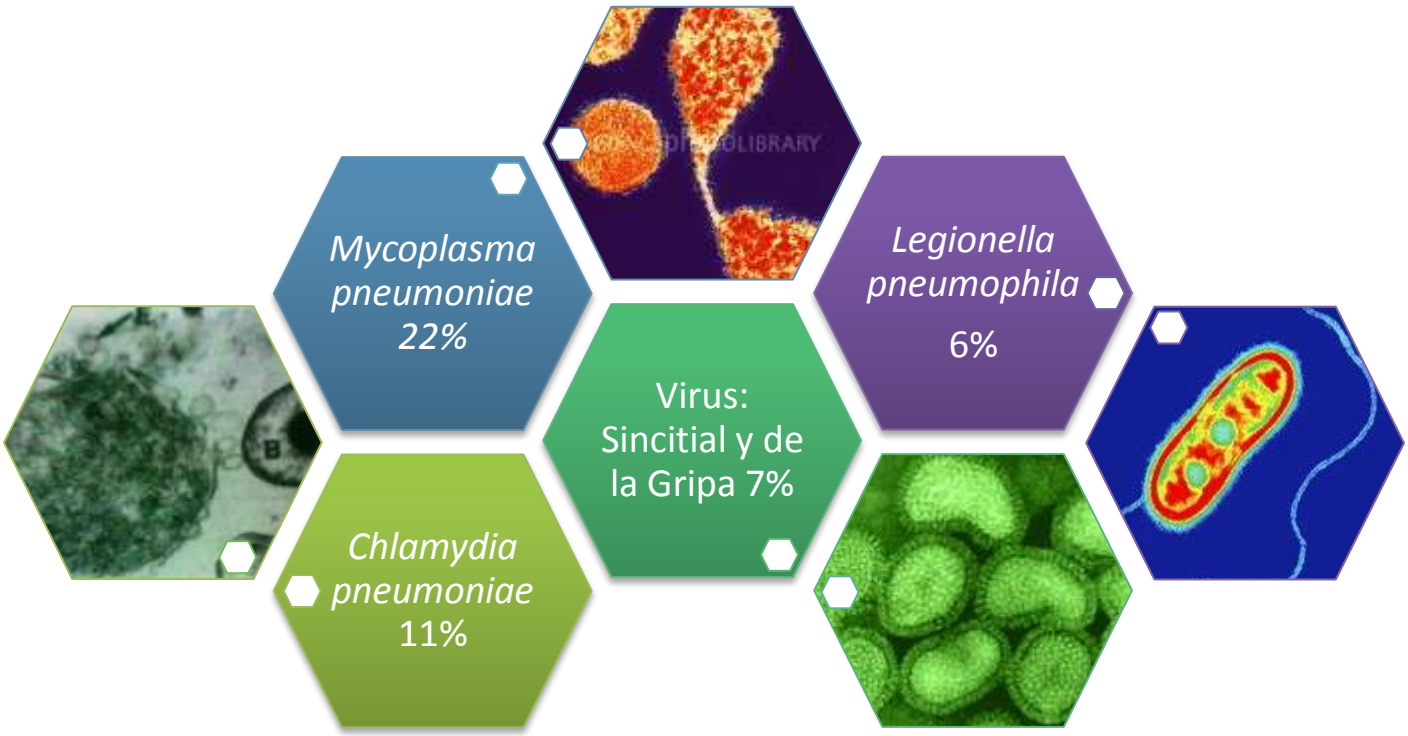


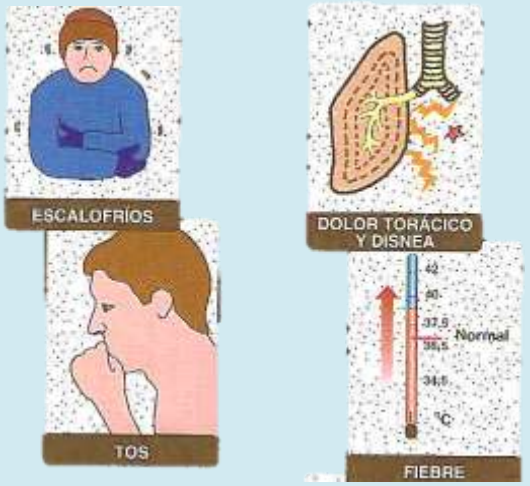
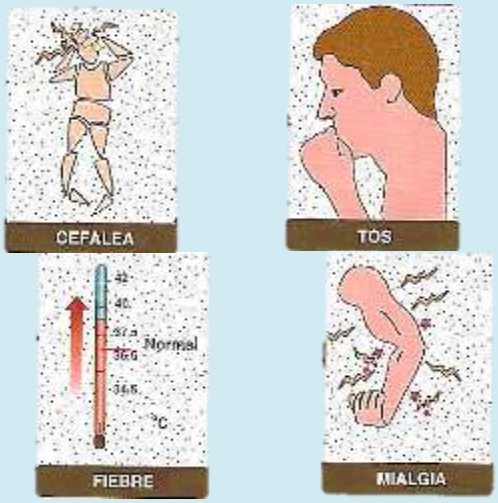
Figura 20.- Patógenos más comunes por incidencia aproximada en % causantes de neumonía atípica [41]

1. Neumonías extra hospitalarias típicas: son la que se adquieren como su nombre lo indica en ambientes extra hospitalarios es decir en la comunidad y es causada generalmente por bacterias siendo *Streptococcus pneumoniae* el principal

causante con un 60%, mientras que *L pneumophila* solo causa el 3%, ataca principalmente a niños y ancianos, los virus respiratorios son los principales causales entre niños pequeños, entre 2 y 3 años. Son de inicio brusco, grave, lobular, a menudo cursa con pleuresía y responde a la penicilina, además de que se cuenta ya con vacunas contra *S pneumoniae*, virus de la gripe, y del Hib que es contra *Haemophilus influenzae*.[33, 41]

2. Neumonía atípica: suele ser de inicio más gradual, menos grave es decir es la forma suave de la enfermedad, afecta a uno o más segmentos pulmonares y raras veces produce dolor pleurítico. Tiene varias causas microbianas siendo *Mycoplasma pneumoniae* la de mayor incidencia con un 22% mientras que *Legionella pneumophila* causa el 6%, tanto *Mycoplasma* como otros agentes microbianos causales de esta neumonía que se observan en la **Figura 20** por su naturaleza intracelular no responden a tratamientos con Penicilina. [33, 41]

En el **Cuadro 8** se observa un resumen comparativo entre la sintomatología de la neumonía atípica y la típica. La neumonía causada por *Mycoplasma* afecta principalmente a adultos jóvenes y puede ir asociada a una anemia, la neumonía por *Chlamydia*s suele ser más leve y con menor tasa de mortalidad, mientras que la producida por *Legionella* afecta a los ancianos y adultos con un gran hábito tabáquico, con enfermedad crónica o inmunosuprimidos, tiene mayor gravedad con respecto a los agentes causales de su clasificación y una mayor tasa de mortalidad, no es posible identificar presuntivamente estos agentes causales por tinción rutinaria de Gram o un cultivo rutinario de esputo. [41]

Cuadro 8 Comparación de síntomas más comunes de las Neumonías Típica y Atípica [41, 42]	
Neumonía Típica	**Neumonía Atípica**
La Neumonía típica se caracteriza por: 1. Escalofríos 2. Esputo purulento 3. Anomalías radiográficas proporcionales a la sintomatología, es decir generalmente localizada. Así como los mostrados en las siguientes imágenes.	La neumonía atípica se caracteriza por 4 síntomas principales: 1. Tos no productiva 2. Variabilidad radiológica de tórax (infiltrados parcheados y difusos) 3. Ausencia de bacterias en frotis directo 4. Ausencia de respuesta a los antibióticos β-lactamicos Así como otros como los mostrados en las imágenes.
	

Capítulo 3 Enfermedades que causa *Legionella pneumophila*

La infección por *Legionella pneumophila* da origen a una neumonía necrosante de focos múltiples, desde el punto de vista microscópico el proceso afecta los alvéolos y bronquiolos terminales, como se observa en un corte histológico de la **Figura 21**, respetando relativamente los bronquiolos de mayor calibre y los bronquios. El exudado inflamatorio contiene fibrina, neutrófilos polimorfonucleares, macrófagos y eritrocitos. [1]

El espectro de las infecciones por *Legionella* comprende 3 grandes tipos: [20]

1. Enfermedad de los Legionarios
2. Fiebre de Pontiac
3. Infecciones Extra pulmonares

3.1 Modo de Transmisión

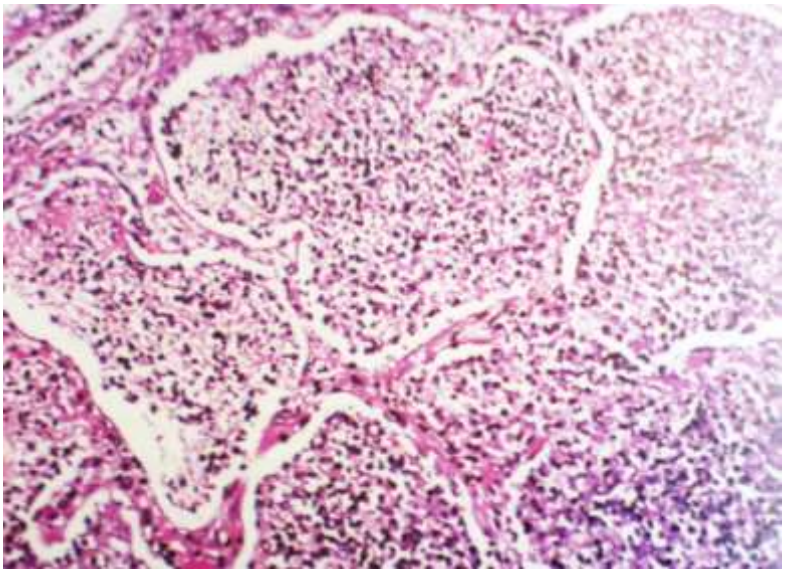


Figura 21.- Corte histológico donde se muestra a *Legionella pneumophila* en alveolos, obsérvese que algunos están llenos de exudado y otros han iniciado su degeneración.[6]

En 1981, durante la investigación de brotes similares de Legionelosis en varios hospitales de la VA, (Veterans Health Administration), la microbióloga, Dra. Janet Stout descubrió que creció y prolifero *Legionella* en agua tibia. "Se puede encontrar en cualquier lugar desde los hoteles hasta en el agua del grifo doméstico, desde los hospitales a las plantas de fabricación e incluso en charcos al borde de la carretera", dijo Stout quien trabajaba en ese entonces en el laboratorio de patógenos especiales del sistema de salud de VA Pittsburgh. [8]

"Hoy en día, sabemos que la mayoría de personas que contraen la bacteria *Legionella* es por la inhalación de aerosoles afectando los pulmones, así como beber agua contaminada o por la inhalación de niebla de fuentes contaminadas, tales como bañeras o duchas calientes", dijo Stout. "Sabemos que la mayoría de los casos ocurren en los hospitales. Los afectados suelen tener enfermedades no relacionadas, o los sistemas inmunes degradados como consecuencia de los tratamientos de cáncer o trasplantes de órganos. Los grandes fumadores también tienen un mayor riesgo". [8]

En efecto, *Legionella pneumophila* es un patógeno que causa infecciones en el tracto respiratorio, principalmente en sujetos vulnerables que inhalan en forma de aerosol partículas infecciosas, en núcleos de gotitas de menos de 5 µm, su capacidad patógena como ya se ha visto anteriormente, está íntimamente relacionada con la facultad de sobrevivir y multiplicarse dentro de los fagocitos alveolares. El organismo es penetrado por inhalación hasta los pulmones donde va a afectar principalmente a alveolos y bronquiolos terminales, es en dichos territorios donde es fagocitado por las células del huésped. [5, 13, 16, 24, 32,]

El inóculo bacteriano que precisa para causar la legionelosis es desconocido, en cobayas susceptibles a la neumonía por *Legionella pneumophila*, se desarrolla una infección asintomática con inóculos tan bajos como 10-100 microorganismos liberados por aerolización, enfermedad con 1,000 bacterias y la muerte, tras la infección por 10,000 bacterias. El contenido de microrganismos en un quiste amebiano o un fragmento de biopelícula pudiera causar la enfermedad. [14]

Desde el punto de vista clínico, la neumonía está presente en todos los casos de enfermedad de los legionarios sugiriendo que el sitio de entrada primario de la bacteria sea el mismo tracto respiratorio. La incidencia depende del grado de contaminación del reservorio acuático, de la susceptibilidad de las personas expuestas a esta agua y también de la intensidad de la exposición. El principal modo de contaminación es la aerolización, así como de la aspiración y casos de ingestión de agua contaminada. [5]

El mecanismo por el cual *Legionella* puede ser transmitida por ingestión es la subsecuente bacteriemia que ocurre después de su penetración en el tracto digestivo, la diarrea es un síntoma muy frecuente en la enfermedad de los Legionarios, se considera a la aspiración de agua contaminada un importante modo de transmisión intrahospitalaria sobre todo en pacientes sometidos a cirugía de cabeza y cuello. [5]

El agua contaminada con una concentración suficiente de microrganismos virulentos del género *Legionella* puede ser aerolizada por los aparatos calentadores refrigerados por agua como las torres de refrigeración, baños de burbujas, duchas, mezcladores de agua o

equipos de respiración asistida, un vez que ha ingresado a los pulmones los microrganismos son fagocitados por macrófagos alveolares iniciando el ciclo replicativo ya expuesto anteriormente. [14]

La concentración bacteriana en los pulmones se incrementa considerablemente como resultado de su mecanismo de replicación y amplificación así, por ejemplo el número de microorganismos de *Legionella pneumophila* en los pulmones de las cobayas se multiplican por 1 millón al cabo de 3 días de infección inicial. Tras la multiplicación intracelular, neutrófilos, nuevos macrófagos y eritrocitos infiltran los alveolos y la consiguiente ruptura origina un edema pulmonar. Las quimosinas y citosinas liberadas por los macrófagos infectados pueden generar una respuesta inflamatoria intensa. [14]

3.2 Enfermedad de los Legionarios, Legionelosis o Neumonía por *Legionella*

Bajo la denominación de legionelosis se engloban diversas formas clínicas de infecciones causadas por bacterias pertenecientes al género *Legionella,* la Neumonía es la forma clínica más frecuente de legionelosis y se presenta bien en forma de brotes o como casos esporádicos. La mayoría de los pacientes con enfermedad de los legionarios tiene neumonía, pero el espectro de las manifestaciones de la infección por *Legionella pneumophila* pueden variar. [7, 39]

La legionelosis causa una neumonía alveolar aguda que no puede diferenciarse con precisión de la neumonía neumocócica. Diversos estudios prospectivos han demostrado que las 2 enfermedades tienen manifestaciones clínicas y radiológicas prácticamente idénticas, solo microbiológicamente se puede realizar la diferenciación por medio de la tinción y cultivo de esputo que se explicara mejor en el siguiente capítulo. [5, 14]

El periodo de incubación va de 2 a 10 días en la mayoría de los casos, aunque se han reportado periodos de incubación de hasta 20 días, pero el promedio oscila en 4 días. Puede observarse un síndrome prodrómico que dura entre horas y varios días, consistente en cefalea, mialgias, astenia y anorexia. La fiebre acompaña a estos síntomas, excepto en los pacientes gravemente inmunodeprimidos. Pueden existir escalofríos, así como diarrea y dolor abdominal, la tos con o sin dolor torácico, aparece con frecuencia horas o días después de los prodrómos. El cuadro clínico inicial suele ser confuso, ya que los síntomas sistémicos suelen ser más llamativos que los referidos al sistema respiratorio, lo que hace que algunos médicos diagnostiquen erróneamente una gripe o una infección gastrointestinal. [14]

El cuadro clínico inicial de neumonía *por Legionella* puede ser semejante a una infección viral tipo influenza (gripe), además de ser de tipo brusco: malestar general, fiebre, escalofríos, cefaleas y mialgias. Las afectaciones a vías respiratorias superiores como la rinitis o coriza no suelen ocurrir. La fiebre suele ser el primer signo que se va elevando con el transcurso de los días y se acompaña de escalofríos que suelen perdurar algunos días antes de que aparezcan los siguientes síntomas respiratorios: tos seca y disnea. El cuadro puede evolucionar a insuficiencia respiratoria grave, rápidamente progresiva, con necesidad de ventilación mecánica. [5, 7, 28, 31.]

El esputo que es muy escaso, al principio es hialino, pero a medida que progresa la enfermedad, la tos se hace productiva y el esputo puede ser espeso, con estrías sanguinolentas o con franca hemoptisis. Los síntomas se caracterizan por participación de otros sistemas como nausea, vómitos y diarrea (tracto gastrointestinal), confusión mental y letargia (afecciones al sistema nervioso central), aun cuando suelen ocurrir pueden ser infrecuentes en la fase inicial del cuadro. Las manifestaciones neurológicas son de encefalopatía global o de signos cerebrales, hemiparesias etc., puede haber signos de irritación meníngea. La producción de una neurotoxina por la bacteria, reacción autoinmune y encefalitis por acción directa de la *Legionella* son posibles explicaciones de la participación neurológica. [5, 7, 35]

La participación renal puede variar desde la elevación transitoria de la creatinina con hematuria o sin ella, leucocituria, proteinuria, cilindruria y piuria, incluso insuficiencia renal aguda con necesidad de hemodiálisis. Es posible que las endotoxinas estén involucradas en estas manifestaciones y se sabe que algunos serogrupos son más tóxicos que otros. Ya se demostró histológicamente *Legionella* en el riñón de algunos pacientes, pero esta es del serogrupo 4 identificada por inmunofluoresencia directa en una paciente con pielonefritis aguda. [5, 14]

Aun cuando la presentación clínica de la neumonía por *Legionella* es inespecífica, existen indicios que pueden hacer sospechar de este diagnóstico en un paciente con neumonía no diagnosticada. Estos son:

1. Ausencia de gérmenes en el esputo en una muestra adecuada
2. Hiponatremia e hipofosfatemia
3. Falta de respuesta de la neumonía a los antibióticos β-lactámicos

Aunque puede ocurrir la hiponatremia en la neumonía de cualquier etiología, este hallazgo es mucho más frecuente en la neumonía causada por *Legionella pneumophila*, sin embargo los intervalos de los valores del sodio son tan amplios que no es de valor diagnóstico en concreto. A la exploración física se pueden encontrar hallazgos de

enfermedad grave, deshidratación, trastornos de conducta con niveles de conciencia variable, a la auscultación pulmonar con estertores crepitantes, ausencia de taquicardia ante la presencia de temperatura axilar elevada. También se han descrito una serie de anomalías inespecíficas en el laboratorio, entre ellas alteración de las enzimas hepáticas como la Aspartato aminotransferasa (AST), Alanina aminotransferasa (ALT), hiperbilirrubinemias, leucopenias, trombopenia, CID, leucocitosis, elevación de la Creatinfosfokinasa (CPK) y Lactato deshidrogenasa (LDH), en el **Cuadro 9** se mencionan variables altamente sugestivas de que se está cursando por una legionelosis. [5, 14]

Una exploración más cuidadosa del tórax y una radiografía de tórax casi siempre demuestra datos de una neumonía, como infiltrados pulmonares alveolares focales, que pueden variar desde infiltrados parcheados a múltiples áreas de consolidación. La cavitación de la consolidación pulmonar se observa en un 10% de los pacientes inmunodeprimidos. En algunos casos esta radiografía inicialmente resulta ser negativa, en la cual se observa el parcheado con infiltrados difusos o focales a los pocos días. No se ha descrito un exantema excepto cuando concurren otros factores como la antibioterapia, la hipoxemia es proporcional a la gravedad de la neumonía y la enfermedad cardiopulmonar subyacente, o cuando la neumonía es suficientemente grave para requerir una estancia en Terapia intensiva. [14]

Cuadro 9. Variables altamente sugestivas de Enfermedad del Legionario [30]

- Epidemiología compatible (sistema de agua sanitaria contaminada, casos previos)
- Hábito Tabáquico
- Ausencia de respuesta al tratamiento con β- lactámicos
- Tinción de Gram de esputo: presencia de neutrófilos y escasos o nulos microrganismos
- Neumonía de presentación o evolución grave
- Datos clínicos:
  - Síntomas: Cefalea, Diarrea, confusión
  - Signos: Fiebre >39°C
- Datos de laboratorio:
  - Hiponatremia
  - Elevación de transaminasas
  - Elevación de la creatina.
  - Leucopenia
  - Trombopenia.

3.3 Fiebre de Pontiac

Es una enfermedad febril aguada auto limitada y de corta duración, que generalmente se diagnóstica exclusivamente durante los brotes de la enfermedad. La clínica habitual comienza con 12 y 36 horas después de la exposición a aerosoles contaminados por el microrganismo tanto en entornos laborales como de gran concurrencia, la tasa de infección es alta, ya que va del 80 al 90% de las personas expuestas a este aerosol. Lo síntomas predominantes son Fiebre, mialgias, cefalea y astenia. También ocurren con menor frecuencia, tos, disnea, anorexia, artralgias y dolor abdominal, al no ser una sintomatología muy grave, los pacientes no acuden a atención médica, autorecuperándose en un periodo de 3 a 5 días desde el inicio de la enfermedad, sin embargo el dato clínico más importante es que no causa Neumonía.[14]

Esta es otra forma de legionelosis producida por *Legionella pneumophila*, que tal vez sea una variante rara dado el escaso número de brotes estudiados desde el inicial, que tuvo lugar en 1968. Se caracteriza por ser una afección de comienzo brusco después de un período de incubación de 36 horas como promedio, según puede ponerse de manifiesto en uno de los brotes estudiados. Las manifestaciones más evidentes son fiebre, escalofríos, cefaleas y mialgias localizadas. En cambio, la tos y otras alteraciones respiratorias son mucho menos frecuentes y lo mismo ocurre con otros síntomas no específicos (vértigo, fotofobia, confusión, insomnio, irritabilidad general, etc). Debiendo destacarse como hechos significativos la ausencia de neumonía y que la enfermedad remite en todos los casos en el plazo de 2 a 5 días sin ningún tipo de tratamiento, lo que constituye una de las más claras diferencias entre esta forma clínica y la enfermedad de los legionarios, por lo que se ha sugerido ser una enfermedad causada más que nada por toxinas En el **Cuadro 10** se observa una comparación del cuadro clínico de la Legionelosis y la Fiebre de Pontiac.[7]

3.4 Infecciones extra pulmonares

Estas infecciones suelen ser raras pero usualmente ocurren como complicaciones metastásicas es decir septicemias, que es una diseminación de la bacteria durante el curso de la neumonía, y se ha reportado en pacientes inmunocomprometidos o en pacientes con un cuadro de enfermedad de los legionarios muy grave e evolución mortal que pueden desarrollar abscesos y otras infecciones localizadas en el cerebro, bazo, ganglios linfáticos así como musculo esquelético y cardiaco. [20, 14]

Cuadro 10.- Resumen de signos y síntomas de enfermedad de los Legionarios y fiebre de Pontiac. [4, 20, 24, 44]		
	Enfermedad de los Legionarios	Fiebre de Pontiac
Mortalidad (%)	15-30	0
Periodo de incubación	2-10 días	1-2 días
Tasa de ataque	<5%	>95%
Factores de riesgo	Múltiples	Ninguno
Curso	Progresivo	Limitado
Síntomas	Fiebre, escalofríos, tos, mialgias, cefalea, dolor torácico, expectoración y diarrea (y en algunos casos confusión y alteraciones del estado psíquico)	Similares a los de la gripe: fiebre, escalofríos y mialgias (en algunos casos tos, dolor torácico y confusión.)
Pulmones	Neumonía y derrame pleural (en algunos casos absceso de pulmón)	Dolor pleural: ausencia de neumonía; ausencia de absceso pulmonar
Riñones	Insuficiencia renal (en algunos casos proteinuria, azoemia y hematuria)	Ausencia de manifestaciones renales
Hígado	Alteraciones moderadas de la función hepática	Sin particularidades de las pruebas funcionales hepáticas
Tracto GI	Diarrea líquida, dolor abdominal, náuseas y vómitos.	Sin particularidades
SNC	Somnolencia, delirios, desorientación, confusión y obnubilación (en raros casos se observaron convulsiones)	Ausencia de manifestaciones del sistema nervioso central.
Momento de inicio	Enfermedad epidémica a finales del verano o en otoño; enfermedad endémica durante todo el año	Todo el año
Evolución	Necesita tratamiento antibiótico	Resolución espontánea

Sin embargo, en otras ocasiones no guardan ninguna relación con dicha afección, entre ellas cabe señalar infecciones en hígado, riñones, peritoneo, pericardio, médula ósea y heridas quirúrgicas, causando enfermedades subyacentes como pielonefritis, peritonitis, infecciones de heridas, abscesos cutáneos, cerebrales y peri renales; sin embargo la afectación más frecuente es la cardiaca, se han comunicado casos de miocarditis, pericarditis, síndrome postpericardiectomia y endocarditis de válvula protésica. En otros

casos la diseminación ocurre en pacientes que no padecen la enfermedad de los legionarios, sino que son inoculados directamente con la bacteria como la ingesta de agua contaminada. [14, 20, 32]

En algunos de estos casos el inicio de los síntomas de la infección metastásica precedió en varios días al diagnóstico de la neumonía, en otros la infección se presentó días o semanas después del desarrollo de la neumonía. La infección metastásica que complica una legionelosis de evolución mortal no ha sido generalmente reconocida antes de la muerte, también se ha descrito la extensión directa, y no metastásica, de un empiema torácico a los tejidos blandos del tórax.[14]

No es infrecuente la afectación pleural, aunque se considera excepcional la formación de empiema y el aislamiento del microorganismo en el líquido pleural, se ha descrito derrame pleural en escasa cuantía desde el 10 al 50% de los pacientes y puede preceder al desarrollo del proceso parenquimatoso. Son muy pocos los casos de pacientes que estén cursando al mismo tiempo una Neumonía y un empiema, en un estudio realizado de 74 necropsias de pacientes diagnosticados de legionelosis con derrame pleural solo 5 casos dieron un volumen mayor a los 200 mL y solo en 2 se halló empiema. [43]

Capítulo 4 Diagnóstico Microbiológico

En presencia de una neumonía significativa acompañada de manifestaciones sistémicas puede orientar el diagnóstico, sin embargo las neumonías causadas por *Legionella* no son lo suficientemente diferentes de las acusadas por otros agentes como para poder fundamentar el diagnóstico, solo, sobre los datos clínicos, por lo que resulta necesario recurrir a procedimientos de laboratorio. [20] Se pueden clasificar en dos grupos como se muestra en el **Cuadro 11.**

Cuadro 11.- Métodos directos e indirectos utilizados en el laboratorio para la identificación de *Legionella* [20]

Métodos Directos	Métodos Indirectos
1. Antígeno Urinario 2. Inmuno fluorescencia Directa (DFA) 3. Detección de ácidos nucleicos 4. Aislamiento	1. Serológicos: Inmunofluoresencia indirecta (IFI), RIA o ELISA

Para lograr el adecuado diagnóstico de una Legionelosis es necesario seguir un protocolo integral, es decir integrando tanto métodos directos como indirectos para así asegurar el correcto diagnóstico de *Legionella pneumophila* [20]

La neumonía por *Legionella* se ha descrito como sobretratada e infradiagnosticada, es decir solo por la sintomatología se comienza a administrar un tratamiento empírico, pero no se llega al diagnóstico confirmatorio y definitivo en los laboratorios, un reflejo de la limitación de las pruebas diagnósticas disponibles, por ejemplo, en un estudio realizado en Ohio, sólo el 3% de los casos esporádicos fueron correctamente diagnosticados. Las pruebas específicas son necesarias para el diagnóstico, pero el cultivo es el método diagnóstico definitivo. Los problemas de las pruebas disponibles son fundamentalmente 3:

1. Inadecuada sensibilidad y especificidad,
2. Falta de rapidez
3. La utilidad de algunas pruebas disminuye cuando la proporción de infecciones por *L pneumophila* disminuye. [14]

En el **Cuadro 12** se muestra una comparación de sensibilidad y especificidad de las pruebas utilizadas en el laboratorio para el diagnóstico microbiológico de *Legionella.*

Cuadro 12.- Pruebas Diagnósticas para la detección de *L. pneumophila* donde se muestra su especificidad y sensibilidad. [27, 32]				
Prueba	Muestra	Sensibilidad	Especificidad	Tiempo para el diagnóstico
Cultivo	Esputo/Sangre	<10%/0-6%	100%/100%	3-7 días
DFA	Esputo	20-68%	99-100%	1 hora
Ag Urinario	Orina	80-95%	98-100%	< 1 hora
Serología	Suero	60-80%	95-99%	6-10 semanas
PCR	Orina/ Sangre/ Secreciones Respiratorias	75-82%/83-100%	90-100%/80-100%	2-4 horas

Sin embargo el diagnóstico de laboratorio ha sufrido una notable transformación desde el aislamiento inicial de este microrganismo. Anteriormente las pruebas iniciales se basaban en la microscopia, los cultivos y la serología. Aunque los cultivos continúan constituyendo el elemento clave del diagnóstico, los inmunoensayos de detección de antígenos específicos de *Legionella* en la orina y las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos han sustituido a la microscopia y serología.[24]

4.1 Recolección, transporte y conservación de la Muestra

Las muestras en las que puede aislarse *Legionella* incluyen secreciones respiratorias de todos los tipos, por ejemplo: esputo y líquido pleural, a pesar de que el esputo no satisface por completo los criterios de purulencia de acuerdo con la cantidad de leucocitos y células epiteliales, ya que en la enfermedad de los legionarios este no es purulento, y puede parecer acuoso o sanguinolento. También los aspirados traqueales, el lavado bronco alveolar, así como otros líquidos, entre ellos el líquido pericárdico y peritoneal que ya han demostrado su positividad para *Legionella* en cultivo, sin embargo estos últimos tiene un bajo inoculo bacteriano se recomienda una previa concentración por centrifugación para el cultivo. [3, 5, 22, 31]

Generalmente no se requieren de técnicas invasivas para obtener secreciones del tracto respiratorio, ya que el esputo es por lo general una muestra adecuada cuando se utilizan técnicas y medios selectivos. No obstante a veces se requiere de técnicas invasivas por las condiciones clínicas del paciente, principalmente para excluir otras causas de neumonía en el huésped inmunocomprometido. Algunas de estas técnicas invasivas son las obtenidas de aspirados transtraqueales, biopsias de pulmón y el líquido pleural. [15,17]

Todas las muestras deben ser recogidas y transportadas en un recipiente estéril con tapa de rosca; si hay posibilidad de desecación, se debe agregar una pequeña cantidad de agua estéril destilada, se debe evitar el uso de solución salina, soluciones fisiológicas, amortiguadoras, o medios de mantenimiento ya que éstas son inhibidoras de *Legionella* por los efectos del sodio, y crecimiento excesivo de la microbiota acompañante. Los médicos principalmente deben ser instruidos en el uso mínimo de solución salina cuando se obtienen muestras de broncoscopia, o aspirado transtraqueal. También los analgésicos como la Lidocaína principalmente sea un inhibidor de *Legionella* y de otras bacterias, por lo que se debe utilizar la cantidad mínima en la broncoscopia para un óptimo rendimiento del cultivo. [15, 16, 17, 25]

No se requieren medios de transporte especiales, ya que las legionelas son generalmente muy resistentes, siempre que se evite la desecación y la exposición a una elevada molaridad (>0.01M) de solución salina y amortiguadores inorgánicos. Todas las muestras deben de ser enviadas al laboratorio lo más pronto posible preferentemente en el curso de 2 horas después de su recolección para evitar el sobredesarrollo de bacterias contaminantes. Si se demora más de 30 min es mejor refrigerarla a 5 °C hasta su envío. La muestra debe ser congelada a -20 °C si la demora es de 24 a 48 horas, en caso de que las muestras se tengan que conservar por días o semanas deben mantenerse a -70 °C o menos. [4, 15, 17, 22, 25]

Para hemocultivos se prefieren los sistemas de lisis- centrifugación, para ello se requieren 10 mL de sangre, así como también la muestra de orina que es sumamente importante para llevar acabo la prueba del antígeno urinario que se explicara más adelante, esta última debe ser colectada por técnica del chorro medio en un recipiente a prueba de fugas y procesada en las próximas 24 horas, si el examen se retrasa se debe refrigerar a una temperatura de 2 a 8 °C o congelada a -20 °C. Para investigación epidemiológica se pueden realizar cultivos de muestras de agua corriente de tuberías, torres de refrigeración, ductos de ventilación etc. [17]

4.2 Examen Directo Macro y Microscópico

El examen macroscópico de muestras pulmonares puede contribuir a que el anatomopatólogo selecciones las áreas más adecuadas para obtener material de cultivo o tinción con DFA, deben prepararse extendidos directos de exudados o preparados por contacto o muestras de material fresco de biopsia pulmonar como las improntas de pulmón como la de la **Figura 22**, las muestras congeladas también son útiles para el diagnóstico. [4, 15]

El examen histológico revela la presencia de infiltrados pulmonares con neutrófilos, macrófagos, cantidades importantes de fibrina en los espacios alveolares y una vasculitis séptica de los vasos de pequeño calibre. La histopatología corresponde a una neumonía bacteriana y difiere de la asociada con la neumonía causada por *Chlamydia, Mycoplasma* o virus. [4]

Se puede utilizar el método de Gram usando fucsina básica en lugar de safranina en muestras de esputo, sangre, liquido pleural, aspirado transtraqueal y pulmonar, dada la débil tinción de *Legionella*, y por lo regular no se utiliza esta técnica de modo directo en estos materiales clínicos a pesar de eso su utilidad radica en ser un indicio útil cuando la presencia de numerosos leucocitos, células epiteliales y pocos o ningún microorganismo sea visible, no así en los exámenes histológicos donde si es posible la visualización de los microrganismos utilizando tinciones de Giemsa o de Dieterle, como se observa en la **Figura 23**.[5, 25]

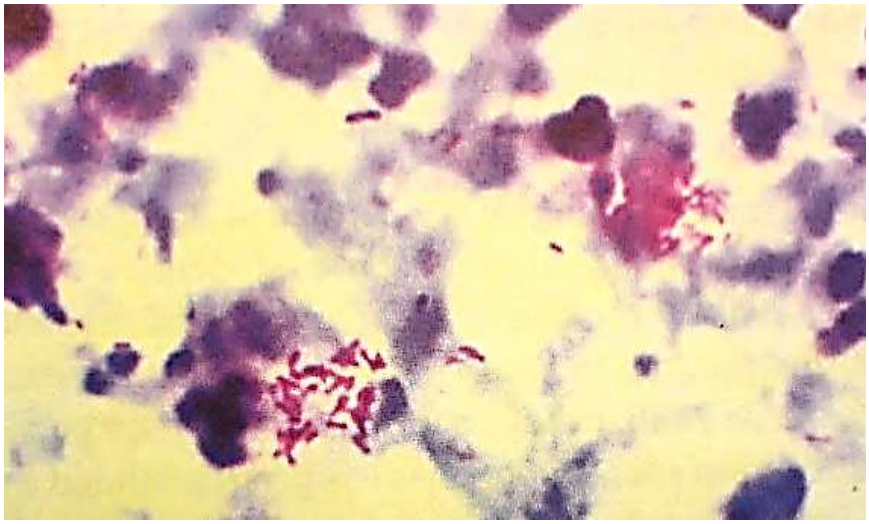


Figura 22.- Impronta de pulmones, muestra a *L. pneumophila* (teñida de rojo) en el interior de los macrófagos alveolares[1]

Figura 23.- Impronta de pulmones, muestra a *L. pneumophila* (teñida de rojo) en el interior de los macrófagos alveolares, tinción de Dieterle. (Técnica de tinción ver anexo 2)[42]

4.3 Cultivo y Aislamiento

El cultivo de secreciones del tracto respiratorio, tejidos y líquidos como el esputo, lavado bronco alveolar y bronquial dan el mayor rendimiento para el diagnóstico de enfermedad de los legionarios, en ocasiones los hemocultivos son positivos y muy rara en otros sitios extra pulmonares, como abscesos, líquido peritoneal, pericárdico, válvulas cardiacas protésicas y de abscesos intestinales, dan resultados positivos. Los cultivos de riñón, hígado y bazo también a veces son positivos en casos fatales de enfermedad de los legionarios. No se ha logrado el diagnóstico por cultivo de la fiebre de Pontiac o encefalopatía sin neumonía. [4, 15, 17]

Las placas se deben almacenar durante máximo 2 semanas antes de descartar. Los hemocultivos se almacenan durante un mes. A los 5 días las colonias miden de 3 a 4 mm de diámetro, su morfología colonial tal y como se aprecia en la **Figura 24**, tienen un color blanco grisáceo, o verde azulado, son brillantes, convexas y circulares, todas estas características se resumen en el **Cuadro 13**, pueden exhibir un moteado granular interno similar al vidrio cortado, a la luz ultravioleta pueden no exhibir fluorescencia o amarilla-verdosa. Las colonias son visibles de 3-5 días de incubación tal y como se observa en el esquema de la **Figura 25**. [16, 17, 22, 24, 25, 31]

Las muestras de esputo pueden presentar cultivos positivos a pesar de la existencia de células epiteliales y ausencia de leucocitos, lo que hace que se pueda sospechar de la legionelosis en estas muestras que teóricamente son incorrectas. La mayor ventaja de los cultivos es que no depende del serotipo de *Legionella*, lo que es un defecto de las demás técnicas de análisis de anticuerpos séricos o la determinación del antígeno en orina. El cultivo con frecuencia es la única muestra positiva en el caso de legionelosis causada por otras especies de Legionella. [14]

Los tejidos se homogenizan antes de hacer los cultivos y frotis, mientras que los líquidos corporales estériles se centrifugan durante 30 min a 4,000g , luego el sedimento se agita en un vórtex y se utiliza ya para el frotis y el cultivo. El tratamiento con ácido de especímenes contaminados con otras bacterias antes de su inoculación propicia un mejor aislamiento de *Legionella*. En este procedimiento una alícuota del espécimen es diluido 1:10 con una solución de KCl-HCl al 0.2N y después de agitar por 5 minutos se inocula una porción del espécimen tratado con el ácido. Si la muestra tiene áreas de purulencia o sanguinolentas se seleccionan estas para inocular y realizar el cultivo. Las placas se incuban en aerobiosis en una atmósfera húmeda de 35 a 37 °C, al incrementar el CO_2 sólo se estimula el crecimiento de *Legionella gormanii* de modo que es preferible a veces la

incubación en aerobiosis más que con CO_2, que puede inhibir algunas legionelas.[4, 16, 17, 22, 24, 25]

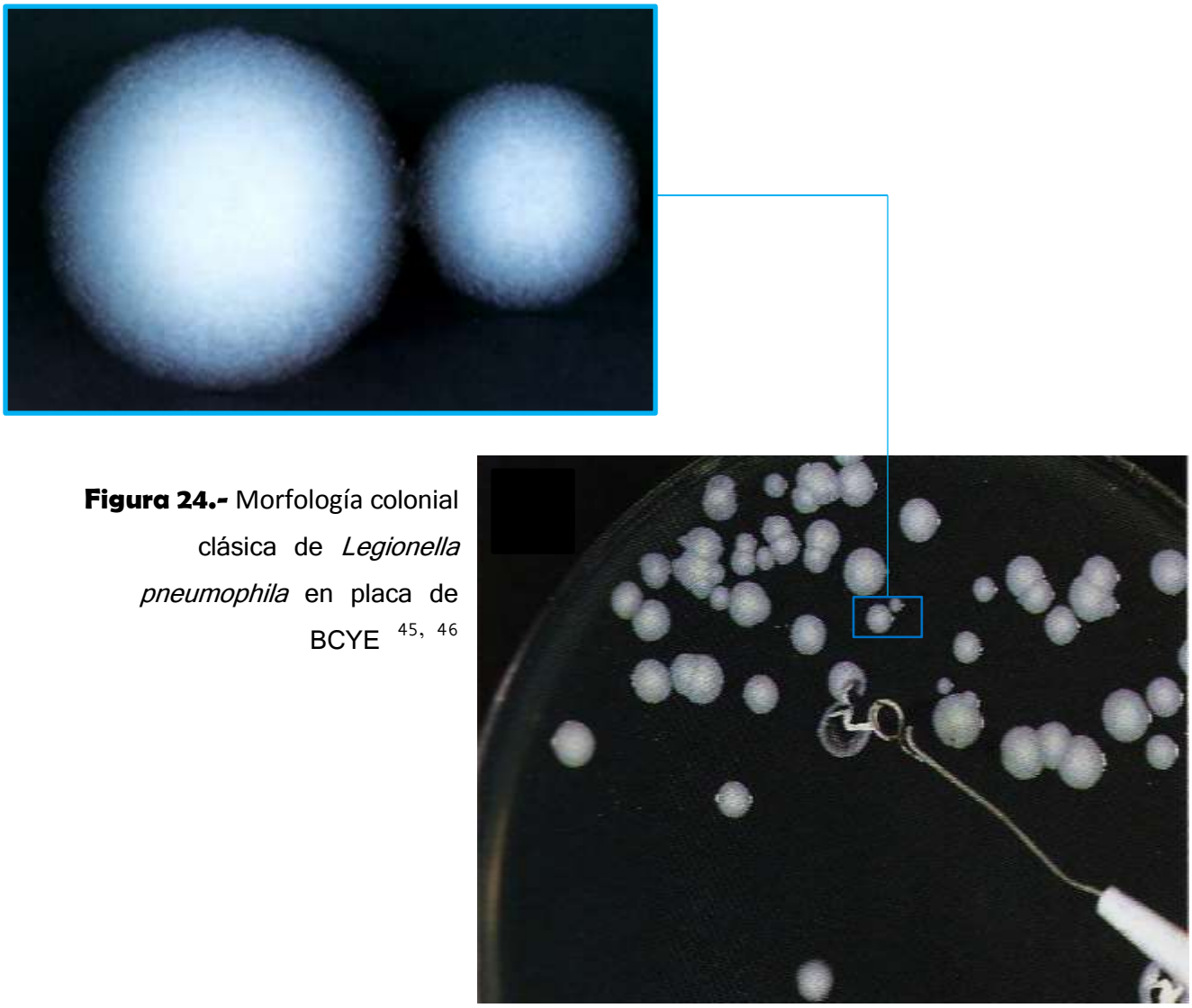


Figura 24.- Morfología colonial clásica de *Legionella pneumophila* en placa de BCYE [45, 46]

Cuadro 13. Morfología colonial clásica de *Legionella pneumophila* [17]	
₪ Crecimiento Lento ₪ Apariencia de vidrio esmerilado o cortado ₪ A los 5 o 7 días mide aprox de 4 a 5 mm ₪ Color blanco- gris- azulado ₪ Brillantes	₪ Convexas ₪ Circulares o Rizoides ₪ Opacas ₪ Pueden no exhibir color con luz UV o en su defecto de color amarillo verdosa.

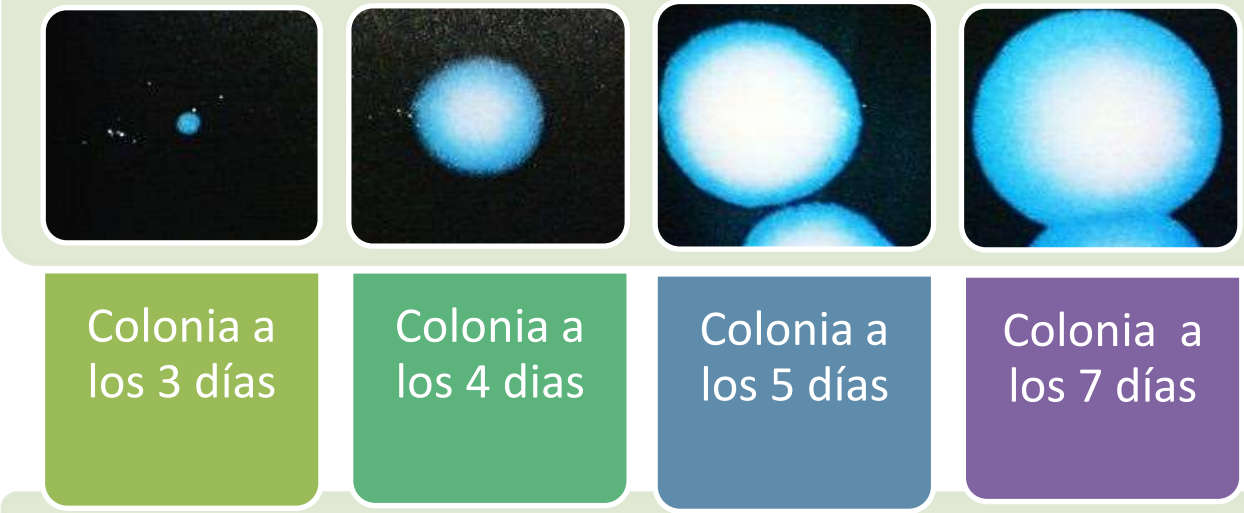


Figura 25.- Esquema de crecimiento de colonias de *Legionella pneumophila* en Agar BCYE a 20X [17]

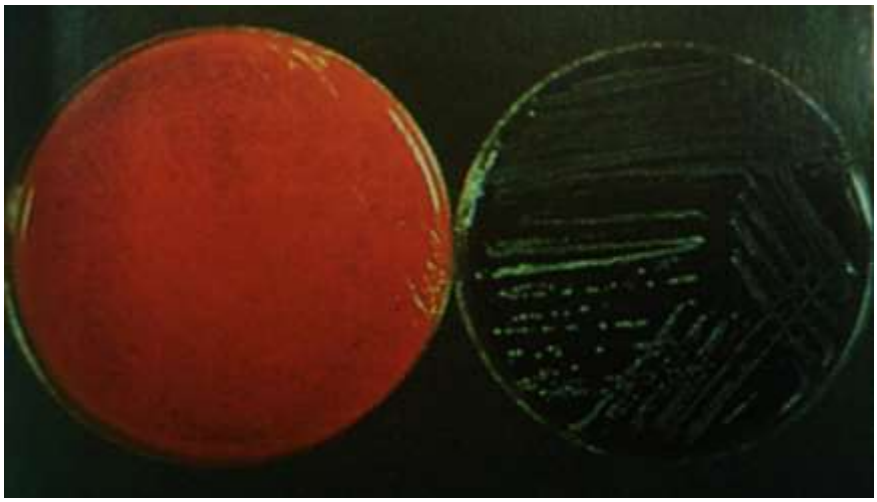


Figura 26.- Cultivo de Esputo en Agar Sangre de Carnero al 5% (ASC 5%) y en BCYE, donde se observa una de las principales características de *Legionella pneumophila*, que es la ausencia de crecimiento en ASC al 5%.[4]

Aunque inicialmente resultó difícil hacer crecer a las legionelas, los medios disponibles en la actualidad han facilitado su cultivo (sensibilidad de 80-90%), ya que como se aprecia en la **Figura 26** no desarrolla en ASC 5%, (Agar Sangre de Carnero) solo en BCYE, su fase intracelular replicativa es muy similar desde el punto de vista ultraestructural a su crecimiento en el agar. Como se ha comentado anteriormente, estas bacterias necesitan para su desarrollo L-Cisteína y sales de hierro (proporcionadas por la hemoglobina y el pirofosfato férrico), y es inhibido por sales de sodio y compuestos aromáticos. [9, 13, 18, 19]

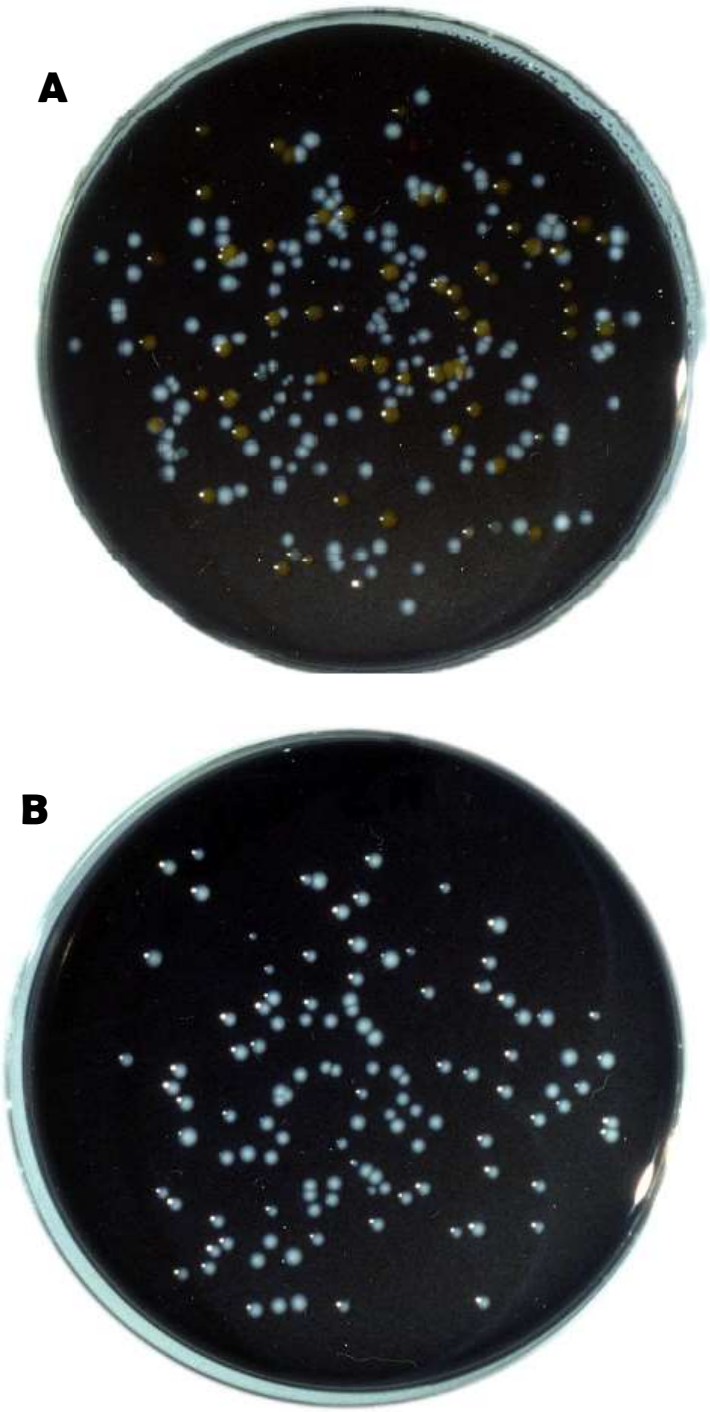


Figura 27.- Morfología colonial de *Legionella pneumophila* en placa de BCYE (A) y en Agar modificado de BCYE (B) obsérvese que en el modificado se obtiene un cultivo más puro [46]

Para el aislamiento de *Legionella* las muestras para cultivo se siembran en tres placas por lo menos, una de Agar BCYE, otra de un modificado o complementado de BCYE, es decir con agentes inhibidores como en el GVPC, y una tercera de ASC 5%, ya que en el caso del esputo que es la muestra mayormente utilizada siempre va acompañada de flora contaminante como se observa en la **Figura 27**.[5, 14, 25]

4.4 Pruebas de identificación para *Legionella pneumophila*

4.4.1 Tinciones

Las legionelas no se tiñen con hematoxilina y eosina en cortes parafinados fijados con formol pero pueden demostrarse sin mayores problemas con las técnicas de impregnación Argéntica de Dieterle como ya se ha mencionado anteriormente y se muestra en la **Figura 23**. Sin embargo las tinciones argéntica son inespecíficas y tiñen a casi todos los microorganismos presentes además de *Legionella*. Como ya se menciono es mejor su demostración en improntas frescas de material de biopsia pulmonar teñidas con las técnicas de Giménez (técnica de tinción ver anexo 2) de la **Figura 28** o de Gram modificada que es la tinción de Gram de rutina pero utilizando fucsina básica en lugar de safranina (técnica de tinción ver anexo 2), como la mostrada en la **Figura 29.**[4]

Como se ha mencionado ya estos microorganismos son patógenos intracelulares facultativos y pueden hallarse en el interior de los macrófagos, neutrófilos y amebas, las legionelas pueden apreciarse en vacuolas fagocíticas o libres en el interior del citoplasma de los fagocitos, así como también bacterias extracelulares.[4]

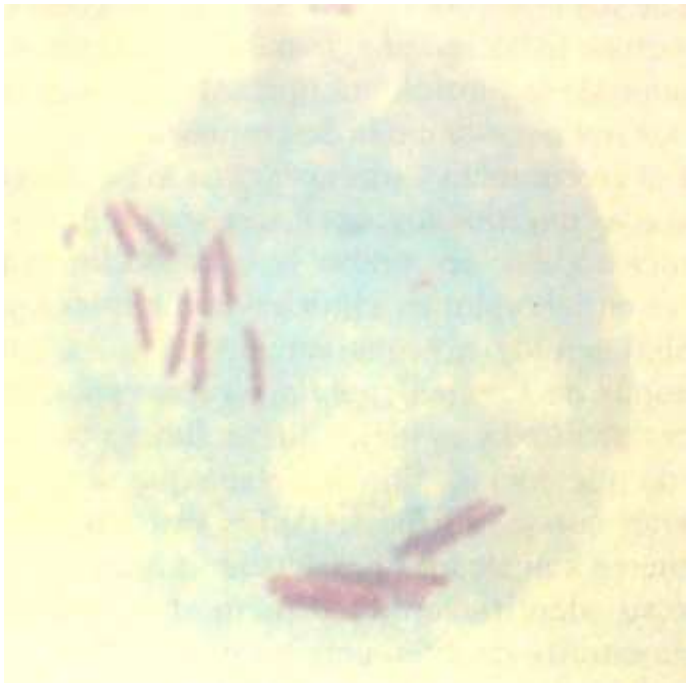


Figura 28.- Tinción de Giménez donde se muestra a *Legionella pneumophila* dentro de una ameba. (Técnica de tinción ver anexo 2)[14]

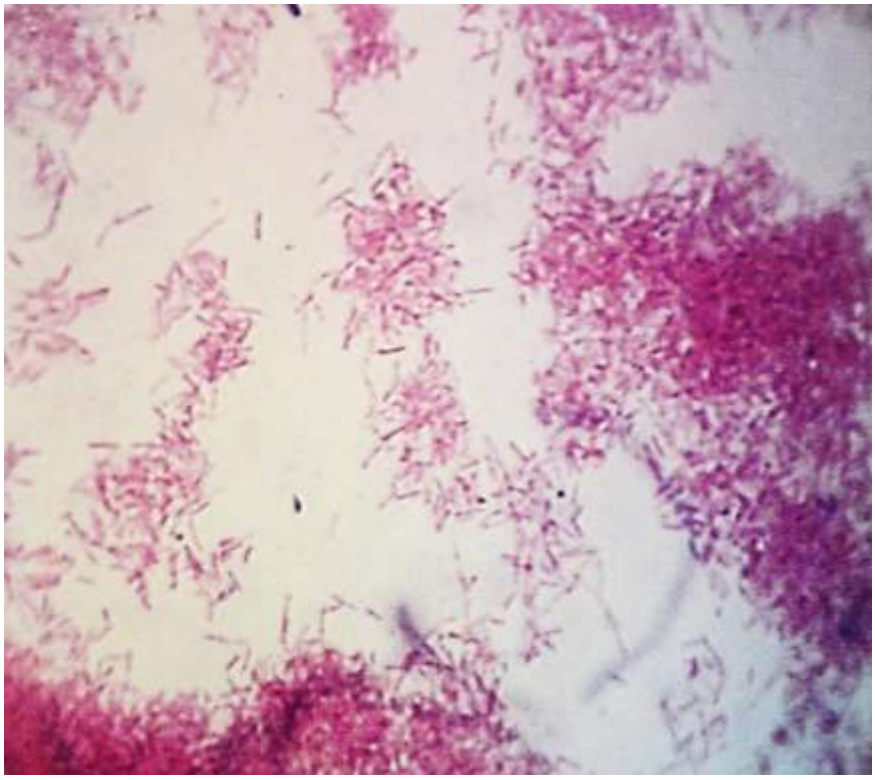


Figura 29.- Tinción de Gram con Fucsina básica en lugar de safranina como colorante de contraste, donde se logra observar claramente a los bacilos gramnegativos de *Legionella pneumophila* (Técnica de tinción ver anexo 2)[24]

4.4.2 DFA: Anticuerpos fluorescentes directos

Las legionelas pueden visualizarse en muestras utilizando varias técnicas de tinción específicas e inespecíficas. En general las técnicas de Gram, Giménez, y Dieterle, son menos sensibles que el examen con Anticuerpos Fluorescentes Directos (DFA) como se observa en las **Figuras 30 y 31**, en la que se usan anticuerpos marcados con fluoresceína dirigidos frente a las especies de *Legionella*. La prueba es específica (especificidad del 99%) y rara vez se observan reacciones falsas positivas cuando se emplean preparaciones con anticuerpos monoclonales, sin embargo la sensibilidad es del 25 al 75% ya que ésta depende del número de microrganismos de la preparación, su detección requiere de un gran número de microrganismos; así como también la preparación de anticuerpos es específica del serotipo o de la especie. La prueba del antígeno urinario ha sustituido al DFA ya en varios laboratorios. [7, 15, 24, 47]

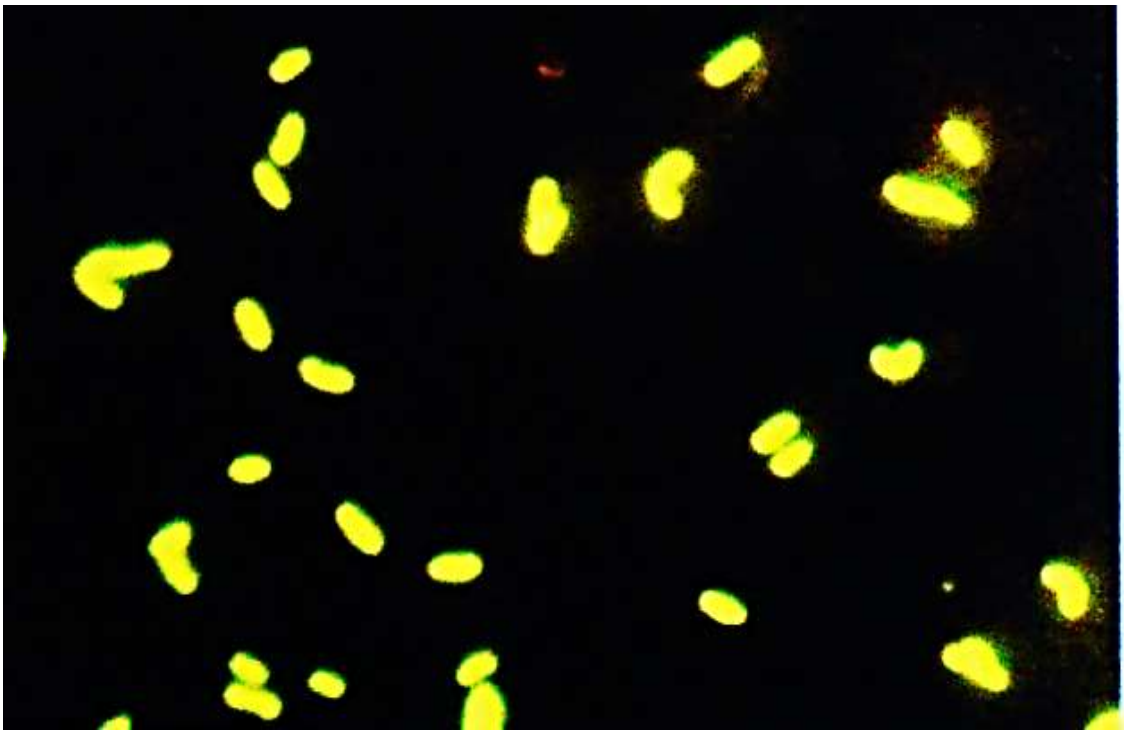


Figura 30.-*Legionella pneumophila* teñida con DFA: anticuerpos fluorescentes directos a 100X [22]

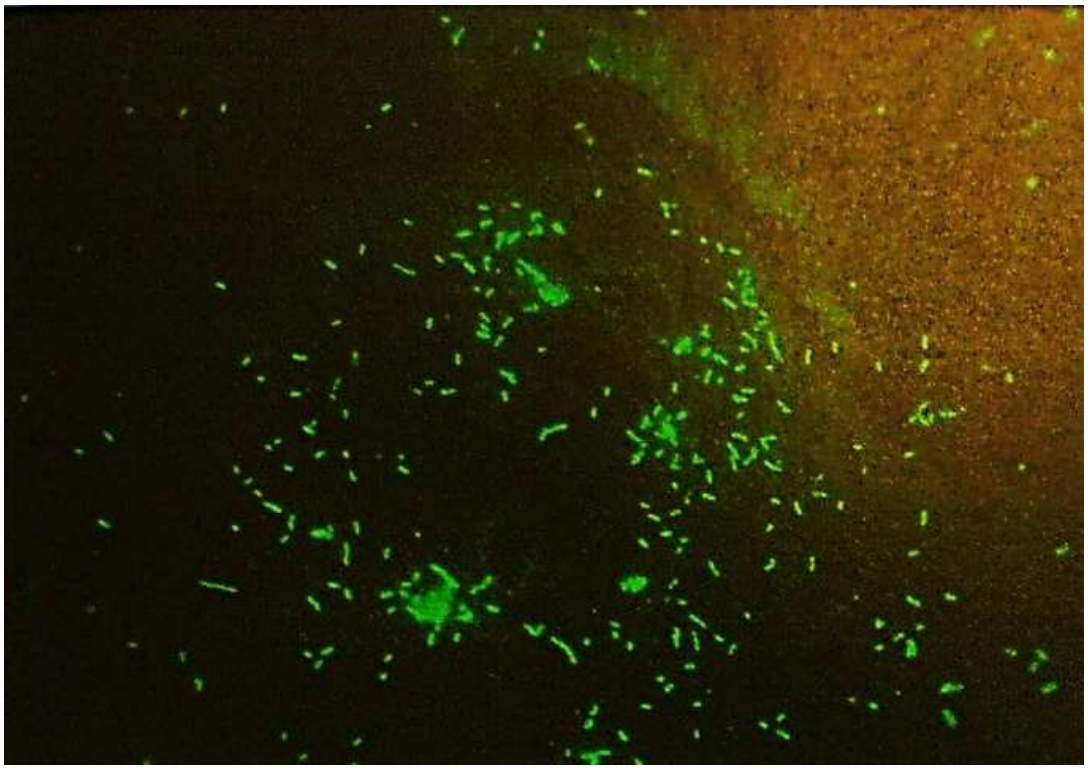


Figura 31.-*Legionella pneumophila* teñida con DFA o anticuerpos fluorescentes directos, 40X. [24]

Es la prueba más usada en muchos centros y la más susceptible al error si no se realiza por personal experto, los anticuerpos monoclonales son superiores a los policlonales y evitan falsos positivos por reacciones cruzadas con otras bacterias. Hay una sensibilidad en promedio menor del 50% pero con una especificidad casi del 100% que la hace muy útil en brotes neumónicos. Se usa en esputo, muestras respiratorias obtenidas por bronco aspiración, broncoscopia y muestras de tejidos. [7, 24, 32]

Sin embargo tiene algunas desventajas importantes, ya que si no se lleva a cabo por un técnico experimentado genera falsos positivos, o como se mencionó anteriormente puede presentar una menor sensibilidad si no hay una carga bacteriana importante. [7, 14, 31]

4.4.3 Antígeno Urinario

La determinación del antígeno en la orina ha revolucionado el diagnóstico de laboratorio para la legionelosis, y en la actualidad es la técnica más solicitada para el diagnóstico de esta enfermedad, esto se debe a que la prueba se lleva acabo fácilmente sin habilidades especiales ya que se realiza un enzimoinmunoanálisis (ELISA) o un radioinmunoanálisis

(RIA), que se emplea para detectar antígenos que son lipopolisacáridos solubles de la pared celular específicos de *Legionella* en la orina de los pacientes afectados, ya que posee una alta especificidad y en ocasiones es la única positiva cuando las demás son negativas. [10, 14, 24, 31]

La sensibilidad de estas pruebas para el serotipo 1 de *Legionella pneumophila* es relativamente elevada sobre todo para anticuerpos monoclonales tipo Pontiac (MAB2+) hasta del 90%, en especial en la orina concentrada por ultrafiltración, sin embargo la sensibilidad para otros antisueros del mismo serotipo son de alrededor del 60%, mientras que para otros serogrupos de esta especie son del 5%. Debido a que la mayoría de los casos de legionelosis de adquisición comunitaria están causadas por *Legionella pneumophila* serotipo 1 y subtipo Pontiac, la sensibilidad media de esta técnica es del 60-70%. [14, 22, 31]

Pueden existir falsos positivos por la presencia de factores de tipo Reumatoide los cuales son fácilmente inactivados, aunque algunos laboratorios no lo hacen, otros autores han realizado un tratamiento previo a la prueba la cual consiste en hervir por 5 minutos y centrifugar la orina para después realizar la prueba con el sobrenadante. Un error clínico es suspender el tratamiento para la legionelosis si esta prueba resulta negativa, se debe recordar que la prueba no es 100% sensible y en algunos pacientes puede tener una sensibilidad muy escasa. [14, 25, 31]

Se ha identificado una lipoproteína especifica de género asociada a la superficie celular en la orina de los sujetos infectados que podría representar una diana diagnóstica dotada de una mayor utilidad. Los antígenos se mantienen en la orina de los pacientes tratados y un 50% obtiene resultados positivos tras un mes y un 25% después de 2 meses, cuando hubo una legionelosis extensa y bilateral en pacientes inmunosuprimidos los antígenos se mantienen hasta por 1 año. [5, 14, 22, 24]

4.4.4 Serología

La prueba serológica más usada es la inmunofluoresencia indirecta (IFI), debido al hecho de ser más accesible desde el punto de vista económico, como por tener una técnica más fácil, pues requiere del procesamiento de las muestras pareadas de suero del paciente sospechoso (fase aguda y de convalecencia). Los pacientes infectados con *Legionella* producen anticuerpos específicos contra muchos de sus antígenos después de 4, 6 y 12 semanas, que son los sueros respectivos que se han de procesar para detectarse por IFI. Serán consideradas positivas las reacciones que muestren, entre la primera y segunda muestra de suero, una elevación del título de anticuerpos como mínimo 4 veces el título inicial. [5, 14]

Es decir, el diagnóstico se basa en un incremento 4 veces el título de 1:128 o más. Hay que medir los títulos iniciales y de convalecencia, estos últimos pueden no detectarse hasta 1 o 3 meses por lo que muchos casos de seroconversión pueden perderse si los sueros de convalecencia se toman demasiado pronto. La sensibilidad de la serología es del 75 al 80% en la infección por *Legionella pneumophila* serogrupos 1 a 4, para otras especies es menor al 50%. [10, 24, 31, 32]

Una sola titulación elevada en ausencia de un cuadro sugestivo o inconclusivo, puede significar infección previa o casi una exposición a cualquier bacteria del genero *Legionella*, el hallazgo de un único título elevado de un mínimo de 1:256 puede considerarse diagnóstico, indicando una infección aguda. Cerca del 20 al 40% de los pacientes presentan títulos altos en la primera semana de la enfermedad, sin embargo en muchos otros casos son detectables a partir de las 3 semanas de haber ocurrido la infección. [5, 24, 31]

4.4.5 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)

La ampliación del ADN por reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real principalmente, es muy sensible. Se ha usado para detectar *Legionella* en orina, muestras respiratorias y suero. El líquido pleural debe ser evaluado tanto para cultivo como en las pruebas usadas para la detección del antígeno urinario. Finalmente como se ha comentado anteriormente puesto que la clónica y la radiología no son tan específicas, si se cuenta con los recursos necesarios se puede hacer. La amplificación molecular y la detección de *Legionella pneumophila* por estos métodos solo esta posible como técnica de investigación, y para establecer epidemiológicamente la relación clonal de las cepas aisladas en muestras procedentes de pacientes y las procedentes de diferentes orígenes ambientales, la mayoría de las evaluaciones realizadas, aunque no todas, han demostrado que los métodos moleculares son tan sensibles como el cultivo o menores. [5, 14, 31, 32]

Si se dispone de técnicas moleculares muy bien validadas pueden constituir una valiosa ayuda para detectar células de *Legionella* en varios tipos de muestras y pueden confirmar rápidamente la presencia de estas células si las anteriores pruebas serológicas son negativas. [7]

La primera ventaja de esta técnica es la habilidad de detectar *Legionella* rápidamente y además detecta otras especies aparte de *Legionella pneumophila*. La amplificación de DNA por PCR de *Legionella* ha sido reportado de pacientes con neumonía utilizando especímenes como: frotis de garganta, lavado broncoalveolar, orina y suero. Dependiendo del espécimen estudiado es la sensibilidad y la especificidad que ha sido reportada del 64 al 100% y 88 a 100% respectivamente. Las secuencias o primers son de

los genes del Mip y los genes 16 S y 5S rRNA, así como también las secuencias de genes para la síntesis de los LPS (lpp0831, wzm, and wzt) para llevar acabo los ensayos de la PCR en tiempo real obteniendo muy buenos resultados. [22]

4.4.6 Caracterización Bioquímica

Dado que las especies de *Legionella* son inertes desde el punto de vista bioquímico y muchas pruebas producen resultados dudosos las pruebas bioquímicas exhaustivas se utilizan poco, pues *Legionella pneumophila* no crece en los medios de prueba con hidratos de carbono comúnmente usados. Por esta razón los hidratos de carbono se incorporan a medios basales especialmente preparados para demostrar su utilización por *Legionella pneumophila.* Algunas de las pruebas para su diferenciación con otras especies importantes del género *Legionella* se exponen en el **Cuadro 14**, mientras que en las **Figuras 32, 33 y 34** se observan placas de BCYE con cultivo de diferentes especies de *Legionella* a las que se les está incidiendo luz UV observándose la diferencia por la fluorescencia de las colonias. [21, 22]

Cuadro 14.- Características bioquímicas del género *Legionella*, AB= Azul Blancuzco, VA= Verde Amarillento, Var= Variable. [4, 21, 22]

Especies	Fluorescen con UV de 365 nm	Oxidasa	Flagelos	Gelatinasa	B-lactamasa	Hidrólisis de hipurato	Requiere L-Cisteína
L. pneumophila	-	+	+	+	+	+	+
L. gormanii	AB	-	+	+	+	-	+
L. oakridgensis	VA	-	+	-	Var	-	-
L. micdadei	-	+	+	-	-	-	-
L. bozemanii	AB	Var	+	+	Var	-	+
L. dumoffi	AB	-	+	+	+	-	+
L. longbeachae	-	+	+	+	Var	-	+
L. jordanis	-	+	+	+	+	-	+
L. feeleii	-	-	+	-	-	Var	+
L. wadsworthii	VA	-	+	+	-	-	-
L. hackeliae	-	+	+	+	+	-	+
L. maceachernii	-	+	+	+	+	-	+
L. birminghamensis	VA	Var	+	+	+	-	+

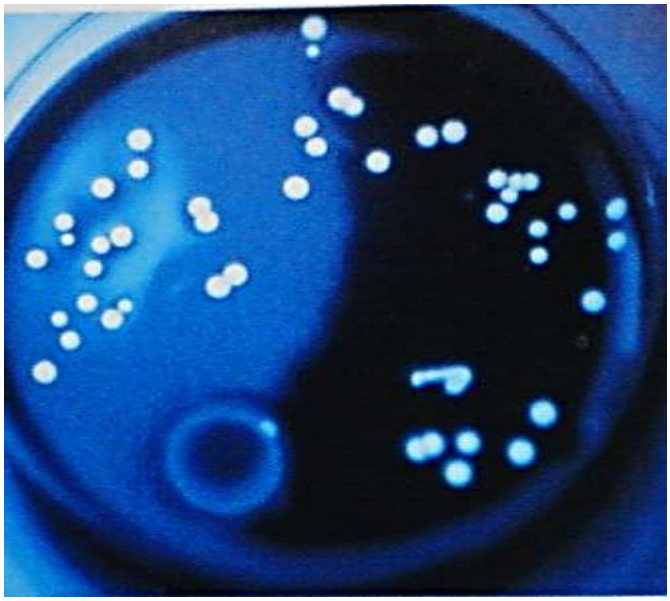
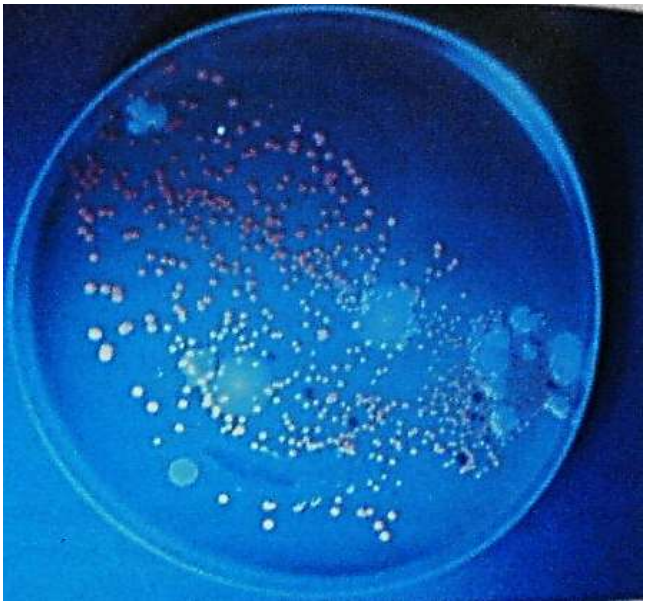


Figura 32.- Ciertas especies de *Legionella* dan una fluorescencia blanco azulada con Luz UV de baja longitud de onda como *L. gormanii*, *L. dumoffi*, o *L. bozemanii* [22]

Figura 33.- Ciertas especies de Legionella dan una coloración amarillo rojiza o verdosa bajo la luz UV de baja longitud de onda, como *L. oakridgensis*, *L. wadsworthii, o L. birminghamensis.* [22]



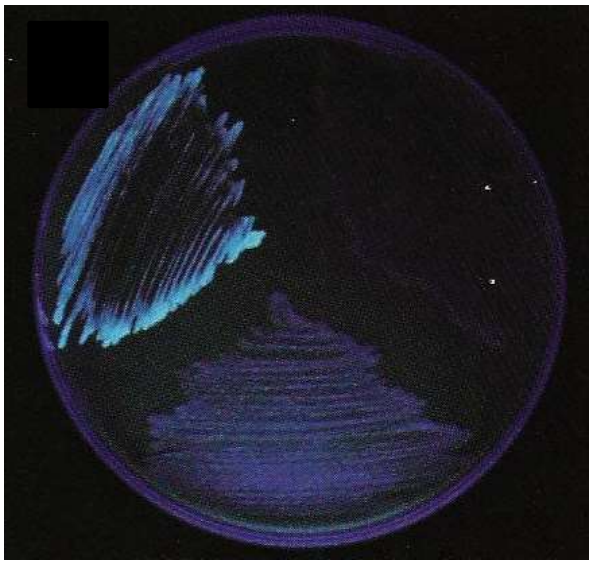


Figura 34.- Placa de BCYE incidida con luz UV observándose tres colonias: *L. bozemanii (blanca brillante)*, *L. micdadei (Blanca opaca)* y *L. pneumophila (incolora).* [22]

4.4.7 Sensibilidad a Antimicrobianos

No existe indicación sobre la realización de pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos para *Legionella*. Esto se debe a la falta de crecimiento de *Legionella* en los medios de cultivo empleados habitualmente para efectuar estas pruebas, además algunos antibióticos que parecen disponer de actividad *in vitro*, no son tan eficaces en el tratamiento de las infecciones *in vivo* debido a que son intracelulares, es decir hay una falta de correlación de la susceptibilidad *in vitro* y la eficacia de los antimicrobianos, así como a la ausencia de un método bien estandarizado *in vitro*, que no inactive a los agentes antimicrobianos. Dado que ahora se dispone de otros agentes, como fluoroquinolonas y los macrólidos más nuevos como la claritromicina y azitromicina, que son más activos contra *Legionella pneumophila*, la eritromicina ya no se emplea tan frecuentemente. [17, 21, 24, 25]

4.4.8 Pruebas Complementarias

I. Radiografía de Tórax

No existen hallazgos radiológicos específicos, un tercio de los pacientes tiene derrame pleural, pueden aparecer abscesos y cavitaciones en pacientes inmunodeprimidos, especialmente los tratados con esteroides. A pesar de un tratamiento correcto es común la progresión radiológica del infiltrado y su desaparición completa puede tardar de 1 a 4 meses. [32]

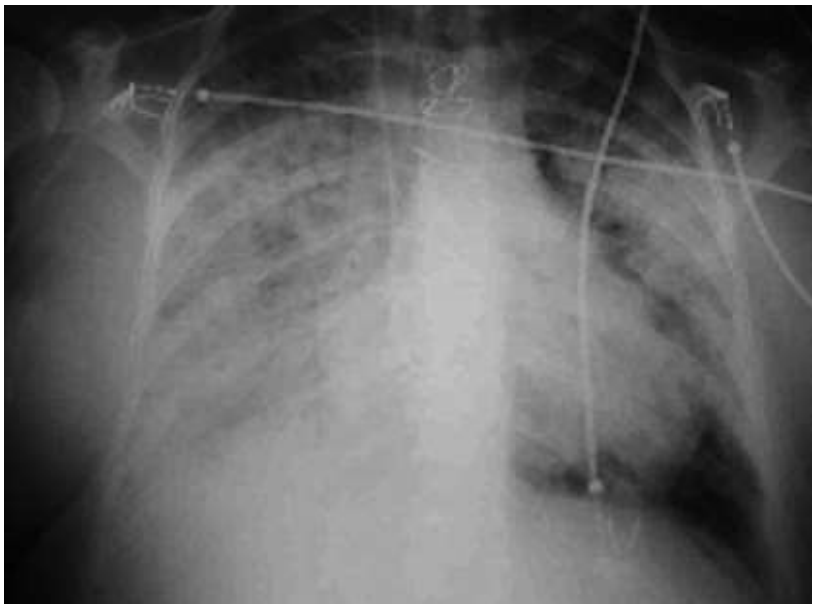


Figura 35.- Radiografía de tórax de un varón de 54 años con Legionelosis donde se muestran infiltrados alveolo intersticiales bilaterales.[48] (Perteneciente al caso Clínico 3, ver anexo 2).

El patrón radiológico de la enfermedad de los legionarios es indistinguible de la observada en otras causas de neumonía. Los cambios radiológicos son visibles desde el tercer día después de la aparición de la enfermedad, por lo general comienza como una acumulación de fluido en una parte del pulmón, que puede progresar a los otros lóbulos, formando una masa o nódulo. [44]

La acumulación difusa de fluido se produce en los pulmones de aproximadamente un cuarto de los pacientes como las mostradas en las **Figuras 35 y 36**. Las radiografías de tórax de pacientes inmunocomprometidos que reciben corticosteroides pueden mostrar zonas claramente definido de opacidad alrededor de los bordes del pulmón, lo que puede confundirse con un infarto pulmonar. Los abscesos se pueden desarrollar en pacientes inmunodeprimidos y, en raras ocasiones, los abscesos pueden penetrar en el espacio pleural, causando la formación de pus (empiema) o una fistula broncopleural (un orificio entre el bronquio y el revestimiento del pulmón, permitiendo que el aire se escape) La cavitación pulmonar puede ocurrir hasta 14 días después de la aparición inicial de la enfermedad, incluso después de la terapia antibiótica adecuada y la respuesta clínica aparente. [44]

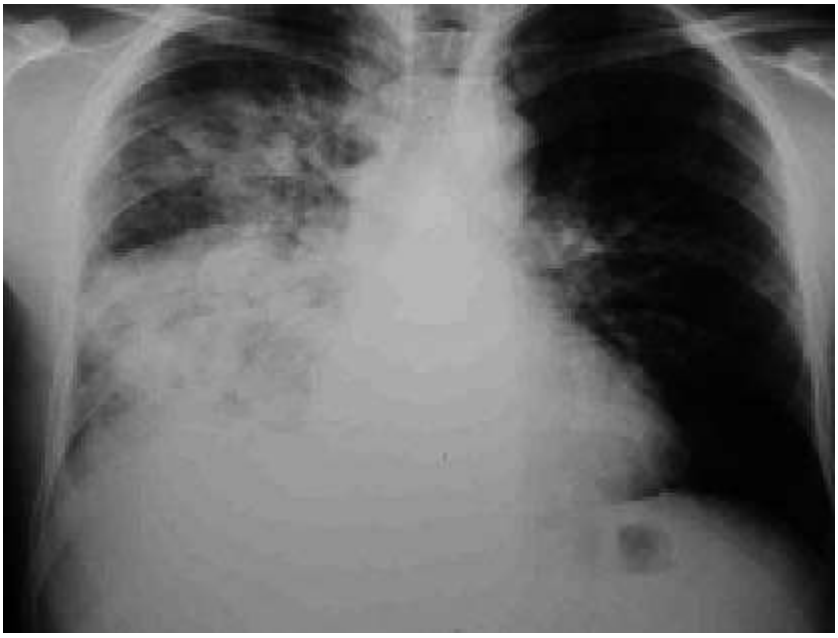


Figura 36.- Radiografía torácica de una mujer de 47 años con Legionelosis donde se muestra infiltrado en hemitórax derecho.[48]

Las radiografías de tórax muestran progresión de acumulación de fluido, a pesar de la terapia antibiótica apropiada, en aproximadamente el 30% de los casos, sin embargo, esto no indica necesariamente una enfermedad progresiva. En su lugar, la propagación indica el fracaso del tratamiento en asociación con deterioro clínico simultánea. Las anormalidades pueden persistir en los rayos X durante un tiempo inusualmente largo, incluso después de que el paciente muestra mejoría clínica sustancial, las tasas de remoción de 60% a las 12 semanas se han reportado. [44]

II. Biometría Hemática

Los datos de la biometría de esta neumonía incluyen leucocitosis con desviación a la izquierda, siendo tan acentuado cuanto más extensa es la neumonía y más delicado el cuadro clínico. Por lo general los pacientes que presentan una leucopenia, tienen un mal pronóstico. La velocidad de sedimentación globular (VSG), suele estar elevada. [5]

III. Química Sanguínea

Los trastornos bioquímicos sanguíneos atribuibles a esta neumonía incluyen aumento de la LDH (>700 unidades/mL) y de las enzimas hepáticas incluyendo bilirrubinas. Estos trastornos suelen ser transitorios y reaccionan al cuadro generalizado, normalizándose con la resolución del proceso. Como característica la gasometría arterial presenta hipoxemia, hipocapnia y alcalosis respiratoria en pacientes con lesiones pulmonares extensas así como una Hiponatremia (<131 mmol/L). [5, 44]

4.5 Resumen: Marcha Diagnóstica

Para obtener resultados óptimos se requiere la realización de más de una de las técnicas comentadas, siendo el cultivo de esputo y la determinación del antígeno urinario las dos pruebas recomendadas. Si ambas resultan negativas, y existen razones clínicas y epidemiológicas fundamentadas para hacer el diagnóstico retrospectivo, semanas o meses más tarde, deben solicitarse pruebas serológicas, si se dispone de técnicas moleculares también pueden ser aplicadas. [14]

En la Identificación del género y la especie de un microrganismo como *Legionella*, el género es relativamente fácil requiriendo solo de algunas técnicas serológicas como el antígeno urinario y la DFA así como de su cultivo y requerimientos metabólicos, no así la especie que es más compleja y a veces imposible, sin embargo la identificación de la especie no es de suma importancia, solo para fines epidemiológicos. Con base en lo anterior en los siguientes diagramas de flujo (**Diagramas 1 y 2**) se expone una marcha diagnóstica para la identificación rápida de *Legionella*. [17, 21, 22.]

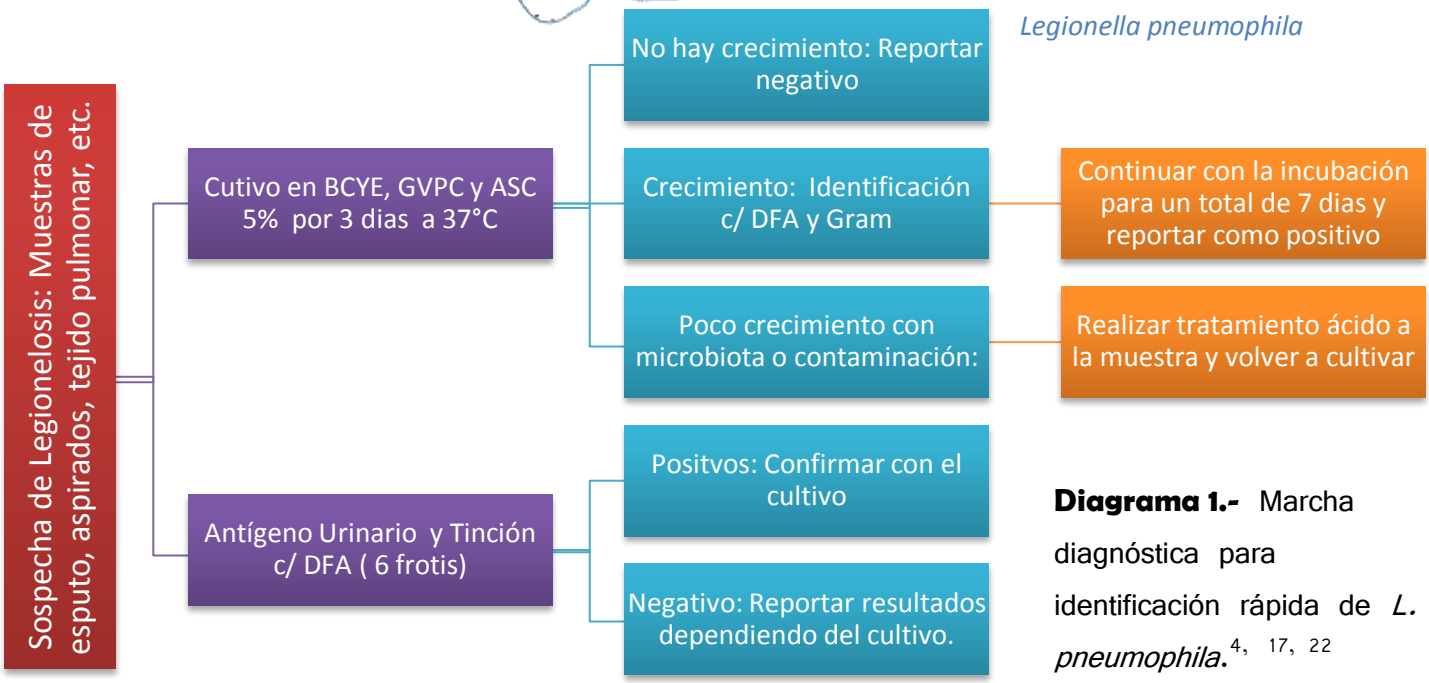
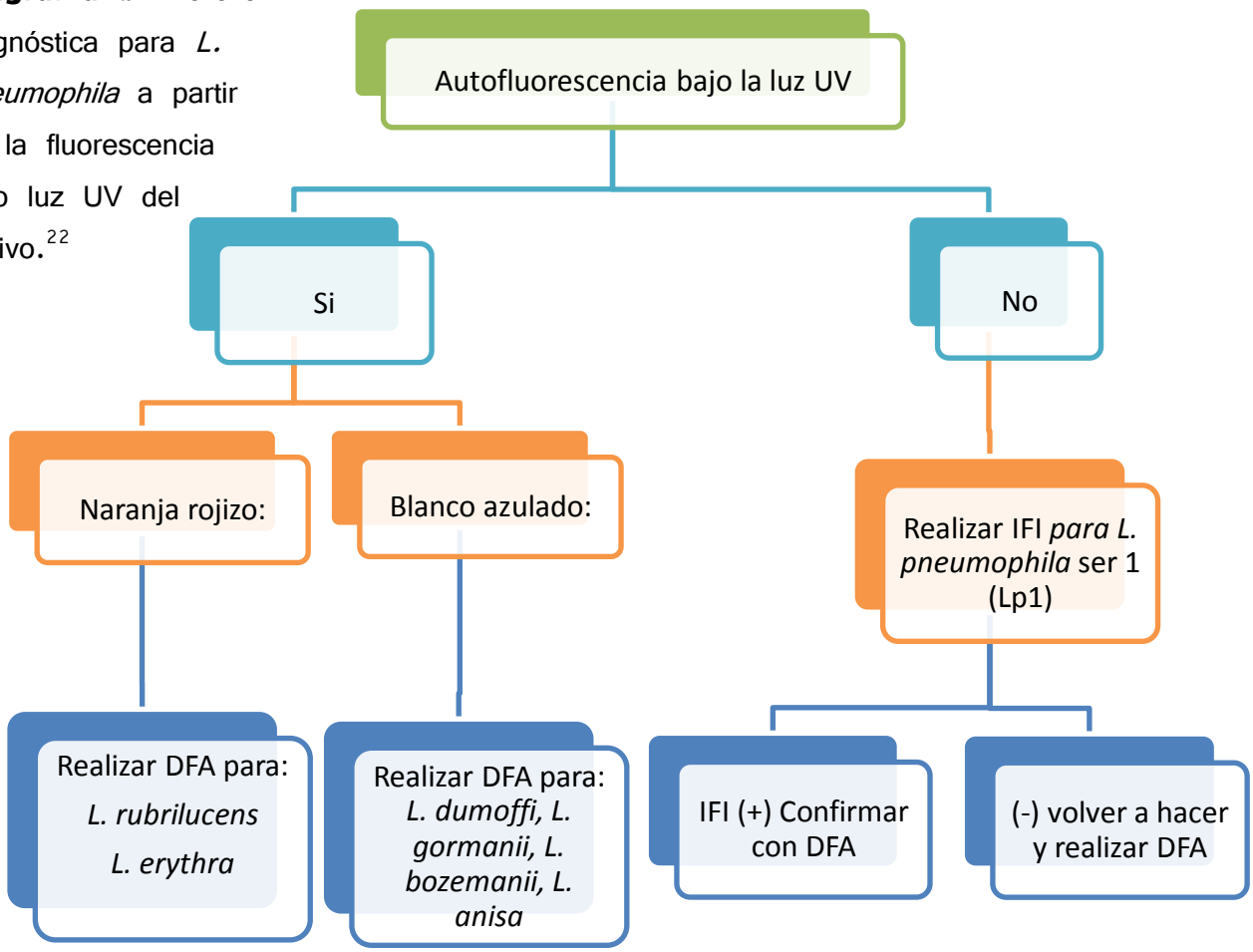


Diagrama 1.- Marcha diagnóstica para identificación rápida de *L. pneumophila*.[4, 17, 22]

Diagrama 2.- Marcha diagnóstica para *L. pneumophila* a partir de la fluorescencia bajo luz UV del cultivo.[22]



4.6 Diagnóstico Diferencial

4.6.1 Diferenciación entre bacterias que causan Neumonía

El diagnóstico diferencial de neumonía por *Legionella* debe de hacerse básicamente con la neumonía neumocócica y con neumonía por *Mycoplasma pneumoniae.*[5]

Para la diferenciación con la neumonía neumocócica de inicio se puede hacer mediante:

1. El tipo de expectoración: debe ser herrumbrosa
2. Radiografía de tórax: La neumonía neumocócica muestra una zona de daño localizada, no difusa o parcheada.

Con esto se descarta la neumonía neumocócica y se comienza a sospechar de agentes causales de neumonías atípicas. En esta clasificación donde se encuentran *Legionella y Mycoplasma* que son los principales microrganismos que se pueden confundir en el diagnóstico del agente causal, esto debido a que *Mycoplasma* al carecer de pared celular, no se identifica en la microscopía del esputo y no es cultivable en medios de cultivo convencionales, dichas características son muy similares al diagnosticar a *Legionella*, pero con la sintomatología, se puede dar un diagnóstico presuntivo ya que las manifestaciones de las vías aéreas superiores como coriza, obstrucción nasal o dolor de garganta, no suelen ocurrir en la Legionelosis, mientras que en la neumonía por *Mycoplasma* u otros microrganismos atípicos no hay sintomatología neurológica y suele ser un diferencial importante. [41, 42]

4.6.2 *Mycoplasma pneumoniae*

Pertenece a la clase de microrganismos llamados Mollicutes, *Mycoplasma pneumoniae* es la especie más importante, es aerobio estricto y también es llamado Agente de Eaton (por el investigador que lo descubrió). [24]

Características más comunes: [41]

- No es posible observarse por tinción de gram porque carece de pared celular de peptidoglicano.
- Son pleomorfos y plásticos, es decir pueden aparecer como cuerpos cocoides o filamentosos, cocoides miden aproximadamente de 0.3 a 0.5 µm de diámetro.
- Carecen de una pared celular sólida y son un “plasma” delimitado solo por una membrana celular trilaminar compuesta por esteroles
- Su cultivo desarrollado en medios especiales, crecen colonias pequeñas y con aspecto de huevo frito pero rara vez se cultivan para un uso diagnóstico.

El Diagnóstico diferencial se hace principalmente con *Legionella pneumophila*, como se mencionó anteriormente ambos son causantes de neumonía atípica, en el **Cuadro 15** se muestran las principales diferencias entre estos dos microrganismos.

Cuadro 15.Principales diferencias entre *Mycoplasma y Legionella*. [20, 24, 44]

	L. pneumophila	*M. pneumoniae*
	Sintomatología y Patogenia	
Tiempo de Incubación	2 a 3 semanas	2 a 10 días.
Sintomatología inicial.	Sx prodrómico que dura entre horas y varios días, consistente en cefalea, mialgias, astenia y anorexia. Hay fiebre, escalofríos, la tos con o sin dolor torácico. Similar a la gripa o influenza.	Febrícula, malestar general, cefalea y una tos seca no productiva, estos síntomas pueden transcurrir así por 2 semanas, y siguen empeorando con el paso de los días, mialgias infrecuentes.
Síntomas en vías respiratorias altas	Infrecuentes	Coriza, obstrucción nasal y dolor de garganta.
Síntomas Digestivos	Diarrea y Dolor Abdominal	Infrecuentes
Síntomas Neurológicos	Cefalea, confusión mental y letargia.	Infrecuentes, solo en complicaciones secundarias.
Evolución	El cuadro evoluciona a neumonía e insuficiencia respiratoria grave rápidamente progresiva, con necesidad de ventilación mecánica.	Puede evolucionar a una traqueo bronquitis con infiltrados al árbol bronquial, resultando en una neumonía atípica.
Radiografía de Tórax	Parcheados difusos en ambos pulmones.	Parcheados difusos en ambos pulmones.
	Diagnóstico de Laboratorio	
Tinción de Gram convencional en Esputo (Microscopía)	No se observan bacterias, solo células epiteliales y PMN	No se observan bacterias, pocas células epiteliales y PMN
Cultivo convencional en placa.	No hay desarrollo bacteriano	No hay desarrollo bacteriano.
Cultivo en medios especiales (BCYE o Agar A7 o Mycoplasma)	BCYE: Desarrollo bacteriano A7 o Mycoplasma: Sin desarrollo bacteriano	BCYE: Sin desarrollo bacteriano. A7 o Mycoplasma: Desarrollo bacteriano, colonias en forma de huevo frito.
DFA	Positivo	Negativo
Serología	IFI positivo	ELISA positiva para Adhesina P1
PCR	Alta sensibilidad y especificidad	Alta sensibilidad y especificidad

Capítulo 5 Tratamiento

La mejor información sobre el tratamiento antimicrobiano aun proviene del brote epidémico original en Filadelfia, la causa de la legionelosis se desconocía por completo en ese momento y los casos se trataron con diversos regímenes terapéuticos. Los pacientes tratados con eritromicina evolucionaron mejor que aquellos que recibieron penicilinas, cefalosporinas o aminoglucósidos. Esto debido a que estos antibióticos no penetran los macrófagos, además de que la mayor parte de las bacterias del genero *Legionella* producen β-lactamasa anulando los efectos de estos. [24, 14]

"Podría ser mortal como tal, la enfermedad del legionario o legionelosis, si el diagnóstico no es temprano y el tratamiento no es eficaz", dice el Dr. Víctor Yu, ex jefe de la Sección de Enfermedades Infecciosas del VA en Pittsburgh. "Los antibióticos para la neumonía común aceptados, no son un tratamiento efectivo para la enfermedad del legionario", dice Yu. "Es por eso que el diagnóstico es muy importante. Cuanto antes un diagnóstico, el tratamiento adecuado puede comenzar más temprano. Los pacientes que reciben un diagnóstico temprano y se tratan con los antibióticos adecuados, tienen una mayor tasa de recuperación. Si el tratamiento se retrasa, o se administran antibióticos inadecuados, la gente puede morir". [8]

Retomando que los microrganismos del género *Legionella* son parásitos intracelulares de los monocitos, implica que todos los antibióticos eficaces para la legionelosis deben concentrarse y bioactivarse en el interior de dichas células. Además, los fármacos intracelulares deben distribuirse en la misma localización subcelular que las bacterias. Los macrólidos, las quinolonas y las tetraciclinas reúnen estos criterios. Por otro lado, ninguno de los antibióticos betalactámicos, monobactámicos, aminoglucósidos o fenoles son activos frente a esta enfermedad, debido a su escasa o nula acción intracelular contra las Legionelas. [14]

Históricamente, la eritromicina ha sido el fármaco de elección para el tratamiento de la legionelosis, sin embargo, debido a su intolerancia gastrointestinal y a la dificultad de su posología, es decir a los efectos secundarios, tales como el malestar gastrointestinal ya mencionado, ototoxicidad, y flebitis, en ocasiones llega a ser suspendido el tratamiento o

se limita su cumplimiento; fue entonces sustituida por claritromicina inicialmente y, más recientemente, por azitromicina. La azitromicina parece tener una mayor actividad *in vitro* y una mejor penetración intracelular y pulmonar, lo cual la convierte en el macrólido de elección para el tratamiento de la legionelosis, como ha sido comunicado en algunos estudios de eficacia clínica. Por otra parte, está bien demostrado que las fluoroquinolonas presentan una excelente actividad in vitro frente a *Legionella pneumophila*, ya que su penetración intracelular puede ser superior a la de los macrólidos y que la eficacia bactericida de levofloxacino, moxifloxacino y ofloxacino es claramente superior a la de eritromicina. [5, 10, 16, 24, 31, 49]

Cuadro16. Régimen terapéutico recomendado para el tratamiento de la legionelosis [14, 20]

Fármaco	Vía	Dosis
Primera elección		
Eritromicina Sola	Intravenosa	500 mg a 1g/ 6horas
Eritromicina c/ Rifampicina	Oral/Oral	500 mg/6h / 600mg/1h
Segunda Elección		
Azitromicina	Oral	500mg 1 día y después 250mg/día
Claritromicina	Oral	250 mg/12h
Ciprofloxacino	Intravenoso	400mg/12h
	Oral	500 mg/12h
Doxiciclina	Oral	200 mg 1ª dosis y después 100 mg/12h
TMP- SMZ	Intravenoso u oral	5 mg/kg de peso/ 8h.

Dado que la eficacia del tratamiento de la legionelosis está condicionada por la naturaleza intracelular del patógeno, es lógico pensar que los antibióticos de mayor utilidad sean aquéllos con una mayor penetración en el interior de las células, como son la azitromicina y las fluoroquinolonas. Estudios no aleatorizados publicados recientemente sugieren que levofloxacino parece producir una respuesta clínica más rápida que eritromicina y claritromicina. Sin embargo, hasta la fecha no se ha publicado ningún estudio comparativo entre levofloxacino y azitromicina. Existen varias opciones terapéuticas frente a la legionelosis que vienen condicionadas por la naturaleza intracelular del patógeno; es preciso pues, que el antibiótico penetre bien y sea activo a nivel intracelular. [5, 49]

La experiencia adquirida en estos últimos años, sugiere la eficacia de otros compuestos como doxiciclina, trimetoprima-sulfametoxazol y más recientemente las ya mencionadas claritromicina, azitromicina y las nuevas fluorquinolonas. En los primeros, eritromicina, claritromicina, doxiciclina, trimetoprima-sulfametoxazol han demostrado actividad

bacteriostática, en contraposición a fluoroquinolonas y azitromicina que son bactericidas. Recientemente telitromicina, teciclina y algunas estreptograminas han sido probadas con aparentes buenos resultados. Sin embargo, en el modelo experimental celular, son las fluoroquinolonas, como clase, las que presentan una mayor actividad intrínseca, bactericida y un efecto postantibiótico es decir después de haberlo aplicado, más prolongado, frente a *Legionella pneumophila*.
[4, 50]

El tratamiento de la Neumonía causada por *Legionella pneumophila* debe de iniciarse lo más precozmente posible, ya que el retraso de su administración se asocia con un peor diagnóstico. Aunque la vía Oral suele adecuada en los casos leves, debe iniciarse por vía parenteral hasta obtener una respuesta clínica que se da al cabo de 3 a 5 días, mientras que en inmunosuprimidos el tratamiento está indicado de 1 a 14 días con macrólidos. La duración del tratamiento debe ser de 14 a 21 días de acuerdo con la gravedad del paciente, y además se previenen recidivas, aunque se prefiere un tratamiento más prolongado si se trata de pacientes inmunosuprimidos. [5, 31]

Capítulo 6 Epidemiología

Las especies de *Legionella* pueden infectar y multiplicarse dentro de algunas especies de amebas de vida libre (especies de *Acanthamoeba* y *Naegleria*) o dentro de biopelículas o biofilms, son microcolonias de bacterias bien organizadas por lo común encerradas en matrices de polímeros que están separadas por canales de agua que eliminan desechos y proporcionan sus nutrientes. Esta propiedad de las legionelas contribuye a la supervivencia en el ambiente, es decir puede sobrevivir en su hábitat en condiciones desfavorables, como con temperaturas de 0 °C a 63 °C, pH de 5 a 8.5, y puede sobrevivir en muestras de agua entre 2 °C y 8 °C por años. [5, 25]

Estas bacterias también son tolerantes al cloro, sobreviven en aguas tratadas y pasan a los sistemas de distribución y refrigeración, donde proliferan. Esto ocurre gracias a sus propiedades antes descritas: formación de biopelículas, así como de la fase quística o fase no replicativa. [5]

Las legionelas son ubicuas y están distribuidas en el ambiente, por consiguiente la mayoría de los individuos están expuestos a las especies de *Legionella*; desde su descubrimiento se han realizado diagnósticos de legionelosis en diferentes regiones del mundo demostrando su amplia distribución, en el **Cuadro 17** se resumen los factores que intervienen en la infección por *Legionella.* [10, 20, 25]

Cuadro 17.- Factores que interviene en la infección por *Legionella* [7,20, 32]

Reservorio	Factores de amplificación	Mecanismo de diseminación	Factores de predisposición	Virulencia de las Cepas
Abastecimiento de agua contaminada (hospital, hotel, domicilio)	Tanques de agua caliente (<50 °C) Tuberías de distribución (sedimento, puntos muertos) Torres de refrigeración, condensadores de evaporación.	Sistemas de aire acondicionado, duchas, grifos, nebulizadores, humidificadores, remolinos de agua, equipos de terapia respiratoria	Susceptibilidad de la persona expuesta: Inmunosupresión, diálisis y diabetes. Intensidad de la exposición.	No siempre las legionelas son productoras de enfermedad, aunque el inoculo es importante, también lo es la virulencia de las mismas.

Las bacterias suelen estar presentes en reservas naturales como las ya mencionadas anteriormente, además de que parasitan a las amebas del agua replicándose en éstas de manera similar a la que se da en los macrófagos, así como también sobreviven en las biopelículas formadas en las cañerías. En los EUA según la CDC se dan de 10,000 a 20,000 casos anuales de legionelosis. [24]

Las legionelosis esporádica y epidémica tienen una distribución universal, entre el 65 y el 75% de los casos descritos no se asocian a epidemias conocidas de la enfermedad, es muy común el infra diagnóstico ya que en muchos casos esporádicos son tratados empíricamente sin realizar estudios complementarios, por la existencia de falsos positivos en ciertas pruebas diagnósticas. Por tanto solo se comunican alrededor de 1,100 casos de legionelosis anualmente (0.4/10,0000 habitantes) a los centros de la CDC en EUA, esta cifra es similar a la descrita en Francia (1.3/10,0000 habitantes por año en 2001) e Inglaterra y Gales en 1998 (0.4/10,0000). [14]

Algunos estudios han colocado a la *L pneumophila* entre los 3 microorganismos que con más frecuencia ocasionan neumonía adquirida en comunidades de pacientes hospitalizados. Con base en un estudio realizado en Ohio, los investigadores de la CDC sugieren que solo 3% de los casos esporádicos de legionelosis serán diagnosticados correctamente. [14]

Un estudio prospectivo en Ohio en población Adulta con neumonía extra hospitalaria que necesitaron hospitalización por Neumonía, reveló que se dan 8 casos por cada 10,0000 habitantes al año, al extrapolar estos datos a la población global de los EUA se estimaron de entre 8,000 a 18,000 casos de legionelosis. En cambio la legionelosis que causa Neumonía sin necesidad de hospitalización no se conoce con certeza. Un pequeño estudio regional norteamericano estimó que la incidencia de legionelosis en pacientes extra hospitalarios tratados de Neumonía oscilaba entre 4 y 28 casos/10,0000 habitantes al año. En conclusión los casos totales de legionelosis van de entre los 18,000 y 88,000 casos anualmente. [2, 8, 14]

Independientemente de estos datos, se estima que la legionelosis es la causa de neumonía extra hospitalaria en población adulta que requiere hospitalización en el 0.5-10% de los casos siendo la media del 2%, se cree que la legionelosis es inhabitual en niños, representa menos del 1% de los casos de neumonía de todos los de este grupo de edad. Se produce en forma de enfermedad nosocomial en niños inmunosuprimidos. Los neonatos tienen un riesgo relativo alto debido a la inmadurez de su sistema inmunitario. Se han descrito casos de la enfermedad en recién nacidos aparentemente normales, tanto nosocomiales como en medio extra hospitalario que fueron expuestos a *Legionella* a

través de aguas contaminadas en incubadoras o baños especiales, así como durante el nacimiento. [14]

6.1 Legionella en Europa

A finales de los años noventa, en Europa y según la Organización Mundial de la Salud, se advirtió un aumento en el número de países con aportación de datos referida a la enfermedad de los legionarios, aun siendo muy variable su incidencia. Las tasas correspondientes al año 1999 variaban desde 19.5 por millón de habitantes en Bélgica, a uno por millón de habitantes en Portugal; mientras que España presentaba una tasa de 7.8. Sin embargo, estos datos podrían estar infravalorados con respecto a la incidencia real, debido a la existencia de *Legionella sp.,* no consideradas por estar desvinculadas del sector turístico. En Europa, las cifras de incidencia notificada varían mucho de un país a otro, dependiendo de las características de los sistemas de vigilancia, en el **Cuadro 18** se presenta una estadística del número de casos de Legionelosis y la forma de contagio de la misma hasta el año 2004. [51]

Cuadro 18.- Tipo de casos de Legionelosis presentados en Europa de la European Working Group for *Legionella* Infections (EWGLI) [51]

Tipo de casos	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004
Nosocomial	105	215	181	195	275	333	277	347	309
Comunidad	617	388	478	679	659	1475	1767	2106	1884
Asociado a viajes	246	290	297	439	500	674	944	927	984
Desconocido	595	451	486	823	722	988	1691	1072	1369
Total	1563	1344	1442	2136	2156	3470	4679	4452	4546

“Estamos ante el primero de una serie de brotes ocurridos en España y que, en el momento actual, ocupan ampliamente los medios de comunicación de nuestro país” A partir de entonces, muchos otros lugares han ocupado los espacios de noticias por esta misma causa. Pineda de Mar en los años ochenta, Granada en 1991, Alcalá de Henares en 1996, Alcoy en 1999, Vigo y Barcelona en 2000, Murcia, el mayor brote de legionelosis registrado, con 805 afectados en 2001, Mataró y nuevamente Alcoy en 2002, prácticamente ninguna de nuestras grandes ciudades ha quedado a salvo de su acción. Desde 1997, la legionelosis es considerada como enfermedad de declaración obligatoria (EDO) en España, el aumento constante de su declaración es un hecho: en 1999 se declararon 430 casos, en 2000: 752 casos, y en 2001: 1,404 casos. [52]

Entre el 4 y el 21 de noviembre de 2000 se diagnosticaron en el Hospital del Mar 48 casos confirmados de neumonía comunitaria por *Legionella pneumophila*. La edad media fue de 67.8 ± 14.3 años (intervalo: 38-93). La incidencia por sexos fue de 31 varones (64.4%) y 17 mujeres (35.4%). El hábito tabáquico estaba presente en el 67.7% de los varones y en el 17.6% de las mujeres. El consumo de alcohol superior a 30 g/día fue reconocido en el 25.8% de los varones y en el 11.7% de las mujeres. Las patologías y condiciones de base predisponentes más prevalentes entre los casos se muestran en el **cuadro 19**. Diez de los pacientes (20.8%) tenían dos o más patologías de base. [53]

Cuadro 19. Condiciones o enfermedades predisponentes para contraer Legionelosis [53]

Número de Casos (%)	Hombres	Mujeres	Total
Tabaquismo	21 (67.7)	3 (17.6)	24 (50)
Consumo de alcohol> 30g/día	8 (25.8)	2 (11.7)	10 (20.8)
Diabetes	11 (35.48)	8 (47.05)	19 (39.52)
EPOC	11 (35.48)	2 (11.76)	13 (27.08)
Cardiopatía	3 (9.67)	6 (35.29)	9 (18.75)
Neoplasia	5 (16.12)	0	5 (10.41)
Insuficiencia Renal Crónica	1 (3.22)	1 (5.88)	2 (4.17)
Infección por VIH	2 (6.45)	0	2 (4.17)
Sin patología de Base	8 (25.8)	4 (23.52)	12 (25)

VIH: Virus de inmunodeficiencia adquirida; EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

El diagnóstico de certeza se realizó en 39 casos (81.3%) por la detección del antígeno de *Legionella pneumophila* en orina, en dos (4.1%) por aislamiento en cultivo de secreciones respiratorias, y en los 7 casos restantes (14.6%) por seroconversión realizada por inmunofluorescencia indirecta con diluciones > 1:128 en la segunda titulación. Siete de los diecisiete cultivos realizados (41.2%) fueron positivos, identificándose la cepa aislada como *Legionella pneumophila* serogrupo I subtipo Pontiac. [53]

La legionelosis es una enfermedad de declaración obligatoria en el estado español. El Real Decreto 2210/1995, por el que se creó la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, establece la declaración semanal para esta enfermedad, con datos epidemiológicos básicos. Antes de 1996 no se consideraba enfermedad de declaración obligatoria a nivel nacional. Desde 1997, año de introducción de la legionelosis en la lista de enfermedades de declaración obligatoria, la incidencia de la enfermedad ha presentado una tendencia creciente hasta el año 2002, con una tasa de crecimiento anual en ese período del 52.5%. [51]

La incidencia de legionelosis ha ido de forma progresiva, durante 1999 se registró en España una incidencia de 4.75 casos por 100,000 habitantes. La enfermedad predomina en áreas urbanas y se presenta habitualmente en forma de casos aislados, aunque se registran brotes epidémicos tanto en el ámbito comunitario como nosocomial. Un reciente estudio epidemiológico de legionelosis realizado en las comarcas de Barcelona durante el período 1992-1999 mostró una incidencia media anual de 1.70 casos confirmados por 100,000 habitantes, siendo el 67% de los casos de origen comunitario y el 8% en forma de brote. La incidencia registrada en 1999 fue de 3.14 casos por 100,000, siendo más elevada en el área metropolitana de Barcelona con un 3.47 por 100,000. [53]

El brote de neumonía comunitaria por *Legionella pneumophila* de la Barceloneta, con 54 casos declarados, es uno de los brotes más extensos ocurrido en nuestro país. Aunque en su mayoría el brote fue atendido en nuestro hospital, a los 48 casos descritos hay que añadir otros 6 casos asociados epidemiológicamente y que por diferentes motivos ingresaron en otros centros. Paralelamente, el Instituto Municipal de Salud Pública se encargó de la realización de encuestas epidemiológicas e investigaciones medioambientales del área de la Barceloneta, estudio que permitió identificar a la cepa de Legionella pneumophila causante del brote de una de las torres de refrigeración del barrio. [53]

La *Legionella* es una causa rara de neumonías que no requiere ingreso hospitalario, por otro lado es una causa frecuente de neumonía que requiere ingreso en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), a menudo la segunda tras la neumonía neumocócica bacteriémica, aaproximadamente es ingresado el 50% de las neumonías comunitarias atendidas en los servicios de urgencias. De estos procesos, entre el 3% y el 18% precisa ingreso en la UCI. [32, 48]

La *Legionella pneumophila* es el segundo microorganismo responsable de las neumonías comunitarias graves (NCG) que requieren ingreso en la UCI, después de las producidas por *Streptococcus pneumoniae*, y los principales motivos de ingreso son la insuficiencia respiratoria aguda y el shock séptico. La mortalidad de estos pacientes es elevada a pesar de los nuevos antibióticos y las modernas técnicas de diagnóstico, la mortalidad oscila entre el 22 y el 54%. [48]

Del análisis de datos que realiza la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica de España en el periodo 1999-2009, se ha seleccionado la siguiente información acerca de cómo se están presentando los brotes de legionelosis en este país: [6]

- En el periodo analizado se han visto afectadas por la enfermedad 3,402 personas de las que el 86 % requirieron hospitalización, produciéndose el fallecimiento de 138 personas con una tasa de letalidad cercana al 4 %.
- Se registraron 501 brotes: el 68 % en el ámbito comunitario, el 26 % nosocomiales y un 6 % asociado a viajes.
- El número de afectados por brote es inferior a 7, observándose una tendencia a disminuir a partir de 2007.
- El grupo etario afectado más frecuentemente es el de las personas mayores, y en relación al género, se observa un mayor número de casos en hombres que en mujeres, en proporción superior 2:1.
- El número de brotes en 2009 ha descendido respecto a años anteriores

Entre otros datos interesantes también se dio a conocer en qué ámbito se están produciendo los brotes y con qué tipo de instalaciones se asocian: [6]

- En los municipios, es decir en el ámbito comunitario se han producido el 57 % de los brotes (el 60% vinculadas a torres de refrigeración y un 20 % a instalaciones de agua sanitaria, sin que se especifique en el estudio si se trata de circuitos de agua caliente con o sin sistemas de acumulación y retorno o de circuitos de agua fría)
- Asociados a distintos alojamientos turísticos se han producido el 28 % de los brotes (más del 80 % de éstas vinculadas a circuitos de agua sanitaria; el resto a instalaciones tipo bañeras de hidromasajes, spa y otros sistemas análogos de recreo con recirculación de agua caliente y agitación)
- En hospitales (brotes nosocomiales) el 6 % del total, casi todos ellos asociados a los circuitos de agua sanitaria)
- En centros gerontológicos se han producido el 1% de los brotes.

6.2 *Legionella* en México

A principios de 2011 el departamento de Estado de los Estados Unidos emitió un alerta a sus ciudadanos por un brote Legionelosis en el Hotel Wyndham, de la isla de Cozumel, esto tomó por sorpresa a las autoridades municipales, toda vez que ni protección civil y bomberos, ni el cabildo habían sido enterados del contagio, toda vez que la secretaría estatal de salud lo mantuvo en secreto. Trascendió en Cozumel que el secretario de salud, determinará en breve la clausura del hotel Wyndham hasta en tanto garantice plenamente que sus instalaciones hidráulicas están libres de la bacteria *Legionella*; en tanto que personal de la administración del hotel Wyndham garantizó la sanidad de sus instalaciones. [54]

Sin embargo, el Centro del Control de Enfermedades de los Estados Unidos a través del Departamento de Estado norteamericano reveló que en el mes de diciembre de 2010 se registraron nueve casos de contagio por la bacteria de la *Legionella*, lo que ocurrió luego de una "desinfección" de los aparatos de aire acondicionado y sistemas de distribución de agua potable del hotel Wyndham Resort & Spa realizados a consecuencia de una investigación realizada en abril de 2010. [54]

En México sólo se han reportado dos casos con diagnóstico clínico de neumonía por *Legionella*, sin pruebas de laboratorio confirmatorias y ninguno por aislamiento del agente causal, estos fueron del Estado de México y Guerrero, sin embargo el European Working Group for Legionella Infections (EWGLI), una organización no gubernamental que hace vigilancia epidemiológica de los casos de legionelosis que ocurren en Europa desde 1987, asocia a 46 casos ocurridos en turistas con estancia en México entre 1990 y 2005 [2,55]

Hasta el momento, no ha sido notificado ningún brote de legionelosis en México, ni la bacteria ha sido aislada de ningún caso de neumonía, sin embargo es necesario investigar la presencia de ésta bacteria en nuestro país, para iniciar las medidas que permitan controlar su aparición. Si el primer brote documentado en el mundo se dio en un Hotel, no es en estos lugares donde se circunscribe el problema, ya que el brote con mayor número de casos se registró en un hospital de Murcia, España en el año 2002 con más de 500 casos. [2, 55]

Capítulo 7 Prevención y control

La prevención de la legionelosis exige la identificación del foco ambiental del microrganismo y la reducción de la carga microbiana, en la actualidad no se dispone de una vacuna contra las infecciones por *Legionella* aunque se encuentra en etapa de desarrollo. [24]

Para su control los sistemas de agua, sobre todo las torres de aire acondicionado y de enfriamiento por evaporación, así como las zonas estancadas de los sistemas de agua caliente deben desinfectarse o drenarse con regularidad para disminuir el número de microrganismos de *Legionella*, ya que la esterilización total suele ser imposible, el **Cuadro 20** muestra una comparación de sistemas y dispositivos de acuerdo al riesgo alto o bajo para ser focos de infección de *Legionella.* [7, 33]

Cuadro 20. Definición de los sistemas/dispositivos en función del riesgo de *Legionella sp* [31, 51]

Alto Riesgo	Bajo Riesgo
Torres de refrigeración, condensadores evaporativos y sistemas adiabáticos.	Agua fría sanitaria
Agua caliente sanitaria	Sistemas de Agua contra incendios
Agua en recirculación y Agitación permanente (con posible inyección de aire): piscinas de recreo, spas, acuarios etc.	Equipos de humectación (incluso cavas de puros) y aerolización. Sistemas de enfriamiento evaporativos domésticos.
Sistema de lavado de automóviles mediante pulverización: con lanzadera o similar. Túneles de auto lavado.	Fuentes ornamentales Riesgo por aspersión.
Instalaciones termales, saunas o de micro aspersión (hoteles, supermercados)	Sistemas físicos de conducción de aire “tratado”.
Equipos de terapia respiratoria, sonda nasogástrica. Limpieza de heridas.	Camiones cisterna para riesgo de vías públicas.
Recintos de concurrencia pública, climatizados y sometidos a aerosoles (estaciones, parques, etc.)	Sistemas de distribución, bombas de agua y otros dispositivos.
Locales terrazas o similar es que usan agua en aerosol para “enfriar” el ambiente (p ej. toldos, ventiladores con aerosoles)	Circuitos de aire acondicionado con pérdidas de condensado.
Procesos de humidificación usados en industría	Bandejas de condensado
Sistemas con calentadores eléctricos y aerosoles de agua	Unidades de dentistas.

Es necesario mantener mínimo sin cieno estos sistemas de agua, los spas y otros entornos similares de riesgo de crecimiento de la *Legionella* las torres de refrigeración se deben limpiar mínimo con cloro o bien irrigarse con agua a 70 u 80 °C durante al menos 2 horas.[42]

Inmunización y quimiotaxis

No existe una vacuna eficaz frente a la legionelosis y la infección previa no previene necesariamente la reinfección, los experimentos realizados en cobayas han demostrado que una vacuna con diferentes antígenos de *Legionella pneumophila*, puede ser efectiva para la prevención de la mortalidad y otras complicaciones potencialmente letales. Se desconoce hasta el momento si tales vacunas son de utilidad para el ser humano. [14]

La quimioprofilaxis, con un antibiótico de la familia de los macrólidos, se ha demostrado eficaz para prevenir la legionelosis en pacientes inmunodeprimidos, durante brotes nosocomiales de dicha enfermedad. [14]

Modificaciones de infraestructura y mantenimiento

Un diseño adecuado de las edificaciones y los sistemas de tubería pueden reducir la frecuencia y la intensidad de contaminación por *Legionella pneumophila* de los sistemas de agua potable. Entre estas medidas cabe destacar un aislamiento adecuado de las tuberías de agua caliente para evitar el calentamiento de las tuberías de agua fría adyacentes, eliminar las zonas ciegas de las tuberías, eliminar el estancamiento, reducir o eliminar los tanques de depósitos de agua, eliminar la utilización de materiales en las tuberías que potencien el crecimiento de *Legionella pneumophila* y mantener la temperatura del agua caliente por encima de los 50 °C y la fría por debajo de los 20 °C. Sin embargo el mantener en hogares, hospitales o asilos la temperatura del agua por encima de los 50 °C puede originar escaldaduras graves por quemaduras de 3er grado. Por tanto se requiere de la instalación de válvulas termostáticas que controlen la temperatura y prevenir estos daños. [14]

El uso de monocloramia, en lugar de cloro puro para tratar el agua potable de los sistemas públicos de distribución, puede reducir el riesgo de adquisición de la legionelosis nosocomial. El riesgo de una contaminación grave por *Legionella pneumophila* de las torres de refrigeración, y en consiguiente la posible transmisión a edificios próximos a través de aerosol contaminados puede reducirse mediante la instalación de estas torres alejadas de los sistemas de toma de aire, con la instalación de filtros y el mantenimiento continuo y adecuado de dichas torres de refrigeración. Para este fin se deben hacer

cultivos cuantitativos de *Legionella*, de esta manera se comprueba la eficiencia del mantenimiento de las torres y prevenir su colonización. [14]

La construcción de piscinas de burbujas debe realizarse adecuadamente, mantenerse de forma regular y monitorizarse de forma estrecha para prevenir los niveles altos de crecimiento bacteriano entre los cuales a veces se incluye a Legionella. [14]

Cultivos ambientales de *Legionella*

Existe un consenso nacional o internacional escaso sobre la utilidad de obtener sistemáticamente cultivos ambientales para ayudar a prevenir la legionelosis. *Legionella*, que es ubicua en el entorno acuático, casi nunca causa enfermedad, por lo que su detección simplemente en el ambiente no significa que se vaya a producir enfermedad. [14]

Esto combinado con las fluctuaciones naturales y concentraciones ambientales muy variadas y heterogéneas de *Legionella*, hace muy difícil el uso preciso de las concentraciones especificas bacterianas como un determinante para que se produzca la enfermedad, el bajo valor predictivo positivo de los cultivos para predecir la aparición de la enfermedad es una razón fundamental por la que muchas organizaciones no recomiendan el uso sistemático de los cultivos ambientales. Otras organizaciones en cambio si los proponen argumentando que el conocimiento de la presencia de la bacteria en el ambiente puede proporcionar una monitorización adecuada de la enfermedad. Además de estas razones, algunas organizaciones recomiendan o exigen la realización de cultivos para *Legionella* en ellas torres de refrigeración para el mantenimiento de las mismas. [14]

A diferencia de cultivos sistemáticos otras organizaciones recomiendan que en las salas de hospital donde ingresan pacientes inmunodeprimidos sean controlados estrechamente sus sistemas de suministro de agua en búsqueda de *Legionella pneumophila* y que se adopten las medidas oportunas si dichos cultivos resultan positivos. Lo más adecuado es que se analice el suministro de agua de todo el hospital periódicamente. Los cultivos negativos no excluyen la posibilidad de la legionelosis de adquisición nosocomial pero lo hace más improbable. [14]

Prevención Nosocomial

La prevención se debe basar en identificar la fuente ambiental y luego erradicar el organismo. Se usan varios métodos de desinfección aunque, ninguno de ellos es el ideal. El sobrecalentamiento de agua a 70 u 80 °C con lavado distal se puede emplear rápidamente para parar un brote, por ello en aparatos de terapia respiratoria no debe

usarse agua corriente o de la llave. Las unidades de ionización cobre-plata (también llamadas *liquid tech*) también son muy efectivas, mientras que los sistemas de luz UV son muy efectivos cuando la desinfección es localizada, principalmente en la Unidad de cuidados intensivos (UCI) o la Unidad de transplantes. La hipercloración ya no se usa debido a que es corrosivo en los sistemas de plúmbeo y se le ha relacionado con la formación de productos carcinógenos así como abortos en embarazadas, además de la resistencia que presenta Legionella a esta sustancia. Los investigadores han recomendado que, en especial en hospitales donde se realicen transplantes de órganos y médula ósea, se realicen cultivos periódicos del sistema de agua por el riesgo mismo que tienen estos pacientes. [5, 16, 32, 42]

Capítulo 8 Anexos

Anexo 1 Casos Clínicos

Caso 1 [42]

Una joven blanca de 21 años sufre un cuadro de Fiebre y cefalea con desarrollo progresivo de tos seca. A lo largo de los dos días siguientes su tos empeora y se hace productiva con eliminación de cantidades pequeñas de un esputo fluido. La paciente estaba previamente sana, su hermano de 19 años presento un cuadro similar 2 semanas antes.

Dato clínicos:

a) Temperatura de 39.3 °C
b) PA : 105/66 mmHg
c) Hto: 32%
d) Leucocitos totales: 8600/µL
e) Recuento Diferencial: Normal
f) Bioquímica Sérica: Normal
g) Radiografía: La radiografía de tórax muestra infiltrados parcheados bilaterales congruentes con neumonía atípica.

Datos Diagnósticos:

a) Se realizó tinción de gram a muestras de tracto respiratorio (esputo), donde se revelan únicamente escasos polimorfonucleares, sin bacterias.
b) Se realizó un hemocultivo el cual también fue negativo
c) Se realizaron pruebas serológicas como aglutinación en frío, un incremento cuádruple de las concentraciones de Anticuerpos IgG en las muestras séricas de las fases aguda y de convalecencia, idealmente detectables con un intervalo de 2 a 3 semanas para establecer un diagnóstico retrospectivo.

Se diagnosticó neumonía atípica.

Criterios:

La neumonía atípica presenta muchas etiológicas posibles que a menudo son difíciles de clasificar clínicamente. *Mycoplasma* se caracteriza porque no suele causar alteraciones pulmonares clínicas. *Legionella* produce a menudo alteraciones neurológicas y gastrointestinales así como cefalea intensa. Los microrganismos como *Chlamydophila pneumoniae y Coxiella burnetii* quedan descartados también ya que no hubo una previa

exposición a animales domésticos, aves u otros elementos ambientales. *S pneumoniae* queda descartado ya que causa un esputo muy purulento, lo cual es más característico de neumonías típicas.

Con lo anterior se diagnosticó *Mycoplasma pneumoniae* y se administró Eritromicina mejorando favorablemente.

Caso 2 [42]

Un hombre de 41 años y raza blanca es hospitalizado debido a un cuadro de 3 días de duración con fiebre elevada y tos seca. Sus síntomas iniciales evolucionan hacia un cuadro de cefaleas, mialgias y confusión. Los antecedentes personales del paciente son normales excepto por el hecho de que ha sido un fumador intenso durante los últimos 15 años. Recientemente, ha comenzado a trabajar en un centro de remodelaciones al hogar, en el área de exposición de sistemas de agua y spas. Su inspección muestra un paciente con aspecto enfermo y con estertores inspiratorios. Presenta tos con producción de una cantidad escasa de esputo fluido.

Datos Clínicos

a) Temperatura de 40.3°C
b) PA: 110/60
c) Recuento Leucocitario: 16700/µL
d) Hb: 14 g/dL
e) Hto: 24%
f) Recuento Diferencial: Normal
g) Gasometría arterial: pH: 7.42; pO2: 70mmHg, pCO2: 34 mmHg
h) Bioquímica sérica: BUN: 26, Creatinina: 1.6, Sodio: 126 mmol/L, Fósforo Inorgánico: 1.8 mg/dL.
i) Radiografía de Tórax: Se observan infiltrados parcheados (intersticiales) bilaterales en los lóbulos inferiores.

Datos Diagnósticos:

a) Se realizó un Lavado Bronco Alveolar (BAL) y se le hiso una tinción de Gram para descartar *Streptococcus pneumoniae*, revelando escasos PMN, sin bacterias.
b) Se realizó un cultivo del BAL en un medio de cultivo especial (BCYE) revelando al cabo de 72 horas de incubación abundantes colonias.
c) Se realizó la prueba de anticuerpos por fluorescencia directa (DFA) de la muestra obtenida observando bacilos fluorescentes color verde manzana.

Criterios:

Legionella parece ser el microorganismo causal más probable, debido a la diarrea y a los malestares neurológicos como la cefalea y la confusión, así como también la fiebre alta; mientras que *Mycoplasma y Chlamydophila* presentan generalmente una evolución menos activa. Las neumonías víricas cursan a menudo con síntomas típicos de infección del tracto respiratorio superior. *Coxiella* en cambio se asocia con antecedentes de exposiciones a aves. Mientras que el esputo auténticamente purulento, tal y como se da en las neumonía por *Streptococcus pneumoniae* no es compatible con los ya mencionados.

El Diagnóstico Final fue: Neumonía atípica por *Legionella pneumophila* (Legionelosis)

Ante 10 días. Se recuperó gradualmente de su enfermedad y quedo curado tras varias semanas.

Caso 3 [48]

Se trata de un varón de 54 años que, entre sus antecedentes, destacaba ser fumador y bebedor importante y presentar enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), cardiopatía isquémica y fibrilación auricular crónica.

Acudió a urgencias por presentar un cuadro de 4 días de evolución de fiebre no termometrada, aumento de su disnea habitual, tos y emisión de esputos hemoptoicos. El paciente precisó intubación oro traqueal y conexión a un respirador y fue ingresado en la UCI con el diagnóstico de Neumonía Comunitaria Grave (NCG).

Datos clínicos:

a) Obesidad mórbida
b) Taquipnea superior a 40 respiraciones/min
c) Presión arterial de 120/75 mmHg y
d) Fibrilación auricular con respuesta ventricular a 140 lat. /min.
e) Leucocitosis con neutrofilia (16 × 109/l y 84% neutrófilos)
f) Urea 85 mg/dl
g) Creatinina 1,4 mg/dl
h) La gasometría arterial no reveló datos patológicos, con una PaO2/ FiO2 > 300.
i) En la radiografía de tórax se apreció un infiltrado alveolar bilateral (fig. 35)

Datos Diagnósticos:

Se tomaron muestras para el estudio microbiológico de sangre, orina, aspirado traqueal, serología para organismos atípicos, detección de antígeno LP en orina y cultivo en medio

específico. Se inició tratamiento empírico con levofloxacino, 500 mg i.v. cada 12 h y ceftriaxona, 2 g i.v. cada 24 h. La evolución del paciente fue desfavorable, con fiebre alta (39-40 °C), inestabilidad hemodinámica, deterioro de la función hepática y renal, presentando síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO). El paciente falleció al cuarto día de ingreso.

En el estudio microbiológico practicado en el ingreso fue positiva la antigenuria a *L. pneumophila* en dos ocasiones. El resto de los estudios realizados, incluyendo una fibrobroncoscopia con toma de muestras por catéter telescopado y lavado broncoalveolar, fue negativo.

Anexo 2 Tinciones

Gram Modificada[4]

Fundamento	**Se basa en la diferencia de pared celular de las bacterias teniendo la capacidad de retener un colorante primario, o la susceptibilidad de ser decoloradas y tomar el color del colorante de contraste.**
Reactivos	• Cristal Violeta • Yodo- Lugol • Alcohol Acetona • Fucsina básica
Técnica	1. Secar las láminas al aire. 2. Cubrir las placas con la solución de Cristal Violeta por 1min. 3. Enjuagar con agua corriente. 4. Cubrir con solución de Yodo Lugol por 1 min 5. Enjuagar con agua corriente. 6. Enjuagar continuamente con Alcohol Acetona hasta que ya no se observe más colorante disueltos, aproximadamente 10 seg 7. Enjuagar en agua corriente. 8. Cubrir con la solución de Fucsina básica por 1 min 9. Leer las placas utilizando un microscopio con lente de aumento 100X, utilizando aceite de inmersión.
Resultados	Las legionelas se observan en el objetivo de 100X como bacilos teñidos de rosa. (Ver figura 28)

GIMÉNEZ [56]

Fundamento	**La fucsina básica en solución acuosa con fenol y etanol colorea las bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas de colores rojo, magenta y rosado. El verde malaquita da una coloración verde azulada al fondo de los tejidos circundantes. La técnica de tinción de Giménez usa tinciones biológicas para detector e identificar infecciones bacterianas en muestras de tejidos. Esta técnica tiene un gran valor para la detección de ciertas bacterias fastidiosas y de crecimiento lento.**
Reactivos	• Solución stock de fucsina • Buffer de fosfatos • Solución de verde de malaquita 0,8 • Solución de trabajo (preparar fresca para cada uso): 4ml de solución stock de fucsina con 10ml de buffer fosfato
Técnica	1. Secar las láminas al aire. 2. Cubrir las placas con la solución de trabajo por 2min. 3. Enjuagar en agua corriente. 4. Cubrir con solución de verde malaquita por 9seg. 5. Enjuagar en agua corriente. 6. Cubrir nuevamente con solución de verde malaquita por 9seg. 7. Enjuagar en agua corriente. 8. Secar las placas con papel absorbente. Almacenar las placas en un lugar seco hasta su lectura. 9. Leer las placas utilizando un microscopio con lente de aumento 100X, utilizando aceite de inmersión. 10. Registrar los resultados en la hoja de formato de lectura de placas, y luego en el cuaderno de trabajo. 11. Una vez leídas las placas pueden ser almacenadas a temperatura ambiente en un lugar seco.
Resultados	Las legionelas se observan teñidos de rosa oscuro, y deben estar ubicadas dentro de células coloreadas de azul verdoso. (Ver figura 27)

Impregnación Argéntica (Gomori grocott o Dieterle) [4]

Fundamento	**Está basada en que a la presencia de ácido crómico, los grupos hidroxilo de los lipopolisacáridos de la pared celular son oxidados a aldehídos; estos a su vez, reducen el complejo nitrato-plata metenamina produciendo la coloración café a negra, debido a la plata reducida en los lugares de localización de los aldehídos**
Reactivos	• Ácido Crómico • Metenamina al 3 % • Solución de nitrato de plata Metenamina • Bisulfito de sodio al 1% • Bisulfito de sodio al 2 % • Verde brillante • Solución Bórax • Cloruro de oro • Agua destilada
Técnica	Desparafinar la muestra con Xileno y Etanol al 95% 1. Colocar ácido Crómico a la laminilla por 1 hora 2. Agregar Bisulfito de Sodio al 1% por 1 minuto 3. Lavar perfectamente con Agua destilada 4. En un vaso de precipitados colocar una mezcla de Nitrato de plata con Metenamina y Bórax al 3% a 60°C por 30 min 5. Lavar perfectamente con agua destilada 6. Agregar Cloruro de oro de 2 a 5 minutos 7. Lavar con Agua destilada 8. Agregar Bisulfito de Sodio al 2% por 3 min 9. Agregar Verde brillante por 1 minuto 10. Deshidratar y aclarar con etanol y xileno 11. Observar al Microscopio.
Resultados	Las legionelas se ven como cocobacilos teñidos de negro o café oscuro, (Ver figura 23)

Discusión 113

Se elaboró un manual integral de diagnóstico microbiológico específico para la bacteria *Legionella pneumophila*, bacilo gramnegativo que causa neumonías atípicas. Éste trabajo es de tipo integral ya que no sólo incluye como hacer el diagnóstico microbiológico en el laboratorio sino también a nivel de datos clínicos, con conocimiento de sus factores de patogenicidad, inmunidad y virulencia que están ocasionando la sintomatología del paciente, todo esto también está incluido en este manual, compuesto además de las sugerencias para el tratamiento terapéutico en base a los antibióticos más utilizados desde el descubrimiento de ésta enfermedad en 1976 y los innovadores o de reciente descubrimiento.

Otra de las ventajas que se ofrecen es la inclusión de un panorama epidemiológico de la enfermedad que causa, ya que aunque ésta bacteria es ubicua, es decir la podemos encontrar en cualquier lugar del mundo como parte de la flora ambiental y acuática, en algunos países como España o los EUA es frecuente aislarla no solo en el ambiente si no de pacientes que cursan con una Neumonía atípica grave. Así como un capítulo dedicado a la prevención que es una de las mejores armas contra cualquier enfermedad.

La enfermedad de los Legionarios se considera una enfermedad sobretratada e infradiagnosticada, es aquí donde el QFB juega un papel importante al ser parte del equipo de salud que con su formación profesional podrá identificar el agente causal de esta neumonía que es *Legionella pneumophila,* sin embargo su estudio implica tener conocimientos de otras áreas, y el emitir un diagnóstico implica tener bases y criterios sobre lo que se está identificando o se sospecha se va a encontrar, tales como la procedencia anatómica de la muestra y la adecuada obtención de la misma, edad del paciente, zona y condiciones de vivienda, condiciones de trabajo en el laboratorio para el tratamiento de la muestra de tal forma que se puedan obtener resultados óptimos y confiables, que además, deben ser obtenidos en el menor tiempo posible ya que es vital para que el médico pueda iniciar con un tratamiento efectivo a el paciente que este infectado y tenga un pronto alivio, que es el objetivo del profesional de las ciencias de la salud.

Este manual también incluye un capítulo final de anexos, entre los cuales se incluyen un primer anexo compuesto por casos clínicos, 2 de legionelosis y uno de neumonía atípica por *Mycoplasma pneumoniae* esto debido a que es con este último con el que se suele confundir la legionelosis. Lo anterior con el fin de integrar todo lo expuesto en el manual y

como es aplicado a casos reales. Posteriormente se encuentra un segundo anexo en el cual se exponen las técnicas de tinción usadas principalmente para el diagnóstico de *L pneumophila* que son la tinción de gram modificada, tinción de Giménez y tinción argéntica.

Luego entonces este manual integral de diagnóstico microbiológico, servirá de apoyo a la materia de microbiología médica del 9no semestre del área terminal de Bioquímica Clínica, será útil en el módulo de agentes etiológicos bacterianos que causan infecciones en el sistema respiratorio, para que durante el curso sea fácil su comprensión, una vez egresados sea más fácil su aplicación experimental en un laboratorio dando un diagnóstico efectivo y rápido de los pacientes. Cabe señalar que esta obra es inédita, en el sentido de que no hay otra recopilación bibliográfica de esta bacteria constituido en un manual de diagnóstico microbiológico, en 2002 se llevó a cabo una recopilación de varios artículos de una convención en Washington DC de ese mismo año donde el tema central fue *Legionella*, así como el libro constituido de dichas recopilaciones, sin embargo en su mayoría los artículos tratan de cuestiones de secuenciación genómica, pese a ello se lograron encontrar trabajos que aportaron mucho a este manual.

Al ser *Legionella* un microorganismo de baja prevalencia en el país, aunado a las características metabólicas que presenta con otros microorganismos, es de suma importancia preparar a los profesionales del sector salud en su diagnóstico y tratamiento, además del infradiagnostico que se hace de la infección, es decir solo se administra tratamiento pero no se estudia la causa de fondo.

Conclusiones 115

Se elaboró un manual integral de diagnóstico microbiológico para una bacteria causal de Neumonía comunitaria atípica: *Legionella pneumophila*, que aunque es muy poco frecuente en el país, pero de una alta incidencia en países como los Estados Unidos y España donde su diagnóstico es de rutina y hay un alto intercambio de población por turismo, relaciones comerciales entre muchas otras, es necesario el conocimiento integral de esta bacteria, desde su taxonomía y caracterización hasta su diagnóstico y tratamiento ante un eventual caso de legionelosis y que nosotros como QFB´s en el área clínica somos responsables de identificar, así como asesorar al personal de salud que lo pudiera requerir en orientación hacia el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad del paciente, y si es necesario como en la identificación del posible foco de infección.

En conclusión, como ya se mencionó, este manual servirá de apoyo a la formación profesional en el área de microbiología médica que se cursa en el 9no semestre de la carrera de QFB en el área terminal de bioquímica clínica en el módulo de aparato respiratorio.

Propuestas 116

Fomentar más este tipo de proyectos bibliográficos de bacterias patógenas extrañas o poco frecuentes, ya que debido a la gran facilidad de intercambio mundial social que se vive en nuestros tiempos se pueden dar casos esporádicos pero certeros de legionelosis por ejemplo, en lugares donde nunca se habían dado brotes, o donde se tenía controlada, por mutaciones o cambios ambientales vuelven a emerger brotes significativos de la misma, y nosotros como QFB´s debemos conocer estas bacterias para que si hay un eventual caso de alguna de estas enfermedades emergentes o extrañas sea menos difícil su diagnóstico. Así como de bacterias patógenas comunes que pudieran ser emergentes o causar un nuevo brote.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 117

1. Kenneth R, Ray GC. Microbiología médica de Sherris. 5ta ed. México D.F.: Mc Graw Hill; 2010. p. 465-469
2. López MA. Agentes infecciosos. Rev Latin de Microb. 2006;48(2):146-153
3. Portal de la CDC (homepage en internet). Atlanta: CDC; c2012 (actualizada 21 de nov 2012; consultado 25 de nov 2012). Disponible en: http://www.cdc.gov/eid/article/8/1/03-0102
4. Koneman WE, Allen DS. Diagnóstico microbiológico, texto y atlas a color. 5ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1999. p. 463-475
5. Tavares W. Corneiro ML. Diagnóstico y tratamiento en infectología y parasitología. 2ª ed. México DF: Manual Moderno; 2009. p. 657-662
6. Portal de la protección de la salud de España (homepage en internet) Andalucía: Protección de la Salud; c2011 (actualizada el 27 de ene de 2011; consultado el 27 de Dic de 2012). Disponible en: http://www.protecciondelasalud.com/2011/01/que-es-la-legionelosis-en-el-verano-de.html
7. Perea EJ. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Tomo 2. Barcelona: Ed Doyma; 1992. p. 691-697
8. Carrol VJ. Death of a specimen Former VA researches are enraged their Legionella samples were destroyed. The American legion magazine 2009; 28-31.
9. Bennett JE, Dolin R, Mandell GL. Enfermedades Infecciosas principios y práctica. Tomo 2. 4ta ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1997. p. 2338-2347
10. Palmieri JO. Enfermedades infecciosas. Buenos Aires: Héctor A Macchi; 2005. p. 503-505
11. Reinhar M, Youset AK, Barttlett C. *Legionella*. Washington DC: American society for microbiology; 2002. p. 1-9, 31-36
12. Portal de Nature (Homepage en internet) EUA: nature; 2012 (actualizado en 2012, consultado el 25 de noviembre de 2012). Disponible en: www.nature.com/ni/journal/v8/n2/full/
13. Ministerio de Sanidad y Consumo. Viajes Internacionales y Salud. Madrid: Ministerio de sanidad y consumo; 2008
14. Mandell GL, Benett JE, Dolin R. Principles and practice of infectous diseases. 2 vols. 6ta ed. Philadelphia: Elsevier; 2005. p. 2711-2721
15. Lennette HE. Manual de microbiología clínica. 4ta ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1987. p. 470-479
16. Cohen J, Powderly WG. Infectous disease. 2 vols. 3a ed. China: Mosby Elsevier; 2010. p. 1750-1752

17. Mahon CR, Cheman DC, Mauselis G. Text book of diagnostic microbiology. 4ta ed. China: Elsevier; 2011. p. 415-421
18. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. Microbiología médica. 25a ed. México DF: Mc Graw Hill; 2010. p. 281-283
19. Portal del Instituto Pasteur (homepage en internet) Paris: Instituto Pasteur; 2012 (actualizada en May de 2012; consultada en Dic de 2012). Disponible en http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/en/research/scientific-departments/genomes-and-genetics/units-and-groups
20. Rodríguez GJA, Picazo JJ. Microbiología médica Tomo I: Microbiología general. Madrid: Harcourt Brace; 1996. p. 271-277
21. Lennette HE. Microbiología clínica. 3ra ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1982. p. 390-397
22. Murray PR, Jobarron E, Jorgensen JH. Manual of clinical microbiology. 8va ed. Washington DC: ASM Press; 2003. p. 809-818
23. Shevchuk O, Jäger J, Steinert M. Virulence properties of the *Legionella pneunophila* cell envelope. Frontiers in Microbiology. 2011;74(2):1-12
24. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología médica. 5ta ed. Madrid: Elsevier; 2006. p. 391-395
25. Forbes BA, Sham DF. Diagnóstico microbiológico de Bailey y Scott. 12a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009. p. 424-428
26. Schuelein R, Desmond K, Ang Y, Lan R, Van D, Hartland LE. Inmune control of Legionella infectión: an in vivo perspective. Frontiers in Microbiology. 2011; 126(2): 1-6
27. Portal de Metapathogen (Home page en internet) EUA: Metapathogen; c2012 (Actualizada el 22 de Oct de 2012; consultada el 30 de Oct de 2012) Disponible en http://www.metapathogen.com/legionella/
28. Portal de apuntes de salud (Home page en internet) EUA: Apuntes de Salud; c2012 (actualización el 29 de Oct de 2010; consulta el 10 de Dic de 2012). Disponible en: http://apuntesdesalud.com/2010/10/29/%C2%BFque-es-la-legionella-y-como-se-previene/
29. Liliana M. Zamboni M, Zamboni D. Innate imunity to *Legionella pneumophila.* Frontiers in Microbiology. 2011; 2(109): 1-7
30. Davis DB. Dulbeco R. Eisen NH. Ginsberg HS. Tratado de microbiología. 4ta ed. Barcelona: Masson; 1996. p. 687-670
31. Ruiz AV. Moreno GS. Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Madrid: Médica Panamericana; 2005. p. 419-424
32. De la Prieta L R, Barreto GG, Alonso Aj, Canovas FA, Aguirre EC. Infecciones por *Legionella*. Medicine. 2002; 8(66): 3499-3503

33. Spicer WJ. Microbiología clínica y enfermedades Infecciosas; texto y atlas a color. 2da ed. Barcelona: Elsevier; 2009. p. 45, 126-127
34. Becton Dickinson. BBL Agar BCYE. Maryland: Becton Dickinson and Company; 2007.
35. Portal de Plantmedia una división de bioWorld (homepage en internet) EUA: Plantmedia; c2012 (Actualizada el 1 de Dic de 2012; consultada el 22 de Dicimbre de 2012). Disponible en www.plantmedia.com/productinfo/3_43_287_682/30-93/BCYE-Agar-%3Ci%3ELegionella%3C-i%3E-Agar
36. Condalab. Agar Legionella BCYE/GVPC. Madrid: Condalab; 2010
37. bioMérieux. Su aliado en medios de cultivo. México DF: bioMérieux México; 2009
38. Microsoft Encarta y Student Program Manager. EEUU: Microsoft corporation; 2009
39. Portal de la ELF (homepage en Internet) Paris: ELF; c2012 (Actualizada el 27 de Nov de 2012; consultada en Ene de 2013). Disponible en: http://www.es.european-lung-foundation.org
40. Portal de la IQB (homepage en Internet) España: IQB; c2011 (Actualizada el 15 de Feb de 2011; consultada el 15 de Ene de 2013). Disponible en: http://www.iqb.es/neumologia/enfermedades/neumonia
41. Harvey AR, Champe PC, Fisher DB. Microbiología. 2da ed. Barcelona: Lippincott´s illustrated reviews; 2007
42. Swapan KN, Sanjay GR. Microbiología basada en la resolución de problemas. Madrid: Elseviers; 2007. p. 45-52
43. Ferrufino E, Mejía C, Ortíz de la Tabla V, Chiner E. Empiema por *Legionella pneumophila*. Arch Bronconeumol. 2012;48(3):102-104
44. Organización Mundial de la Salud. *Legionella* y la prevención de la Legionelosis. Geneva: OMS; 2007
45. Patryck RM, Baron JE, Tenaver FC, Yolken EH. Manual of clinical microbiology. 7a ed. Washington DC: American society for microbiology; 2005
46. US. Department of Health and Human Services. Procedures for the recovery of Legionella from the environment. Atlanta: CDC; 2005
47. Organización Panamericana de la Salud. Boletín Epidemiológico. OPS. 2001;22(1): 15
48. Sánchez OJ, Amigo MJ, Pérez AJ, Garnacho MJ, Jiménez JF, Ortíz LC. Neumonía comunitaria grave por *Legionella pneumophila*. Med Intensiva. 2002;26(10):504-507
49. Falcó V, Molina I, Juste C, Crespo M, Almirante B, Pigrau C, et al. Tratamiento de la neumonía por *Legionella pneumophila* ¿Macrólidos o quinolonas? Enferm Infecc Microbiol Clin. 2006;24(6):360-364

50. Calbo E. Garau J. El tratamiento antibiótico de la Legionelosis. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2006;24(6):357-9
51. Gea IE. Mezones HE. Haro GL. Acciones de prevención y control de la legionelosis: un reto para la salud pública española. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2012; 29(2):272-76.
52. Guix JO. Epidemias de *Legionella* en grandes ciudades. Agencia de salud pública de Barcelona. 2003;10(8):523-4
53. Jericó AC, Noqués SX, Santos MJ, Félez FM, Garcés JM, Mariñosa MM, et al. Brote epidémico de neumonía comunitaria por *Legionella pneumophila* en Barcelona: "El brote de la Barceloneta". Efecto del diagnóstico y tratamiento precoz. Rev Clin Esp. 2004;204(2): 70-4
54. Portal del Grupo Savi (homepage en Internet) México DF: Grupo Savi; c2011 (Actualizada en Ene de 2011; Consultada en Feb de 2013). Disponible en: http://www.gruposavi.com/blog-aires-acondicionados-mexico/2011/01/brote-de-legionella-en-los-aires-acondicionados-en-cozume-como-evitar-estos-brotes/
55. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Epidemiología sistema único de información. México: Secretaria de Salud; 2005
56. Solmara B, Rodríguez F. Manual de procedimientos para el diagnóstico por laboratorio de Rickettsiosis. Instituto Nacional de Salud; 2011