



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**PRINCIPALES ASPECTOS PATOGENICOS, CLÍNICOS Y DE DIAGNÓSTICO
DEL GÉNERO *LEGIONELLA*.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO
DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA**

**AUTORA: CAMILA ESCOBAR VILLALOBOS
PROFESORA GUIA: TM Mg. PAULINA ABACA CASTILLO**

TALCA-CHILE

2021

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2022

Agradecimientos

“A todos los que pusieron un poco de sí en mi formación académica y personal durante esta etapa de mi vida.

A los docentes de la escuela de Tecnología médica, en especial a la profesora Paulina Abaca Castillo, por su comprensión y apoyo en el desarrollo de esta memoria.

A mis amigos y compañeros por su ayuda y paciencia en los momentos más difíciles”

Dedicatoria

“Dedico mi memoria de pregrado a mis padres; Nahin Escobar V. y Gladys Villalobos V., por su amor, esfuerzo y apoyo durante cada momento de mi vida. También a mi hermana Valentina, por estar siempre a mi lado. Además a mis hijos, Álvaro de dos años y Arelis de un mes, los dos regalos más hermosos que me ha entregado la vida”

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
RESÚMEN	7
INTRODUCCIÓN	8
OBJETIVOS	10
1. OBJETIVO GENERAL	10
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA Y ORGANIZACIÓN DE LA INFORMACIÓN	11
MARCO TEÓRICO	12
1. INTRODUCCIÓN AL GÉNERO <i>LEGIONELLA</i>.	12
1.1 Taxonomía del Género <i>Legionella</i> .	12
1.2 Morfología y características bioquímicas.	15
2. PATOGENICIDAD Y MECANISMOS DE VIRULENCIA	22
3. ECOLOGÍA Y TRANSMISIÓN DE <i>LEGIONELLA SPP.</i>	31
3.1 Ecología de las especies de <i>Legionella</i> de importancia clínica	31
3.2 Transmisión de <i>Legionella spp.</i>	33

3.3	Factores de riesgo en el hospedero	36
4.	IMPORTANCIA CLINICA EN HUMANOS	38
4.1	Enfermedad del legionario	39
4.2	Fiebre de Pontiac	39
5.	DIAGNÓSTICO CLÍNICO	45
6.	SENSIBILIDAD Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	56
7.	EPIDEMIOLOGÍA	59
7.1.	Epidemiología en Chile	60
8.	TRATAMIENTO Y PROFILAXIS	62
	CONCLUSIONES	67
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1: Taxonomía del género <i>Legionella</i>	12
Tabla N°2: Especies y serogrupos de <i>Legionella spp.</i> asociadas a enfermedad	14
Tabla N°3: Diferencias entre las características bioquímicas de <i>L. pneumophila</i> y <i>L. longbeachae</i> .	16
Tabla N°4: Medios de cultivo para <i>Legionella spp.</i>	20
Tabla N°5: Cuadro comparativo entre las dos entidades clínicas que ocasiona <i>Legionella spp.</i>	40
Tabla N°6: Manifestaciones clínicas, de laboratorio y radiológicas de la neumonía por <i>Legionella spp.</i>	42
Tabla N°7: Principales características de la legionelosis.	43
Tabla N°8: Muestras respiratorias y citológicas de donde se puede obtener <i>Legionella spp.</i>	47
Tabla N° 9: Comparación de las principales técnicas diagnósticas.	54
Tabla N° 10: Principales tratamientos para minimizar la supervivencia y multiplicación de <i>Legionella spp.</i>	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. N°1: Tinción de Gram de <i>Legionella pneumophila</i> .	17
Fig. N°2: BCYE-Agar sin L-Cisteína para <i>Legionella</i> .	18
Fig. N°3: Esquema del mecanismo infeccioso de <i>Legionella spp.</i> , en un macrófago alveolar.	24
Fig. N°4: Esquema de los principales mecanismos de virulencia de <i>Legionella spp.</i>	25
Fig. N°5: Esquema representativo de la formación de un biofilm por <i>L. pneumophila</i> .	29
Fig. N°6: Transmisión de <i>Legionella spp.</i>	34
Fig. N°7: Factores de riesgo del hospedero.	36
Fig. N° 8: Esquema resumen de las muestras y pruebas utilizadas en el diagnóstico de <i>Legionella</i> .	48

RESUMEN

La familia *Legionellaceae* a la fecha presenta más de 60 especies, distribuidas de forma ubicua en ambientes tanto naturales como artificiales. *Legionella spp.* son microorganismos cuyos ciclos vitales son realmente sorprendentes, pudiendo desarrollarse extracelularmente o como parásitos intracelulares de amebas y otros protozoos acuáticos. Cuando crecen extracelularmente forman comunidades organizadas de células agregadas, denominadas biofilms, que pueden presentar diferentes estructuras e incluso integrar otros microorganismos, como protozoos y algas. Desde ahí mediante sus diversos mecanismos virulentos pueden transmitirse al ser humano y causar principalmente dos cuadros clínicos diferentes, siendo el agente etiológico principal *L. Pneumophila* serogrupo 1. A pesar de la mejora en los métodos de diagnóstico, aún existe un bajo conocimiento clínico de este fascinante microorganismo, dado a que la pesquisa de laboratorio se basa la identificación de la especie y serogrupo más prevalente. A nivel mundial continúan ocurriendo brotes de la enfermedad del legionario, lo que hace necesario crear un protocolo de vigilancia de la legionelosis, en conjunto con pautas de tratamiento, y un enfoque profiláctico para reducir la incidencia de esta enfermedad prevenible. El objetivo de esta revisión bibliográfica es actualizar la información con respecto a los aspectos principales del género *Legionella*, destacando aspectos de su patogenicidad y virulencia, en conjunto con las principales manifestaciones clínicas y las pruebas diagnósticas más utilizadas en la detección de esta bacteria. Se sugiere que a futuro se mejoren las pruebas diagnósticas, utilizando pruebas rápidas, específicas y sensibles para las especies patógenas para el ser humano con el fin de tratar la infección de forma oportuna. Además, controlar y prevenir la contaminación de sistemas de aguas, aires acondicionados, entre otros sistemas artificiales, con el fin de evitar la trasmisión de la bacteria.

Palabras claves: *Legionella spp.*, *Legionella pneumophila*, enfermedad del Legionario, legionelosis, fiebre de Pontiac.

INTRODUCCIÓN

A pesar de que han pasado varias décadas desde el devastador brote de neumonía registrado en 1976 en la American Legion Convention en Filadelfia, todavía existe un bajo nivel de conciencia clínica con respecto al patógeno causante de la enfermedad. Ese brote fue el hallazgo que permitió conocer y llevar a la detección de *Legionella pneumophila*.

El género *Legionella* se estableció en 1979, tres años después del primer brote registrado y se ha informado de que diferentes cepas de este género como; *Legionella pneumophila*, *Legionella longbeachae* y *Legionella feeleii*, causan enfermedades respiratorias humanas a las que se les ha denominado legionelosis, siendo el término colectivo para los síndromes clínicos causados por miembros del género *Legionella*, que pueden presentarse como fiebre de Pontiac o enfermedad del legionario, dos entidades clínicas distintas. Las manifestaciones de la infección van desde la gripe leve hasta una neumonía grave que también afecta a otros sistemas del organismo. La sintomatología incluye: fiebre, tos no productiva, dolor de cabeza, mialgias, escalofríos, disnea, diarrea y delirio, que empeora y progresa hasta una neumonía con insuficiencia respiratoria, que conlleva en algunos casos a la necesidad de asistencia respiratoria mecánica.

Legionella spp. no se considera como un patógeno transmisible de persona a persona, más bien, la infección se produce principalmente a través de la inhalación de aerosoles contaminados con la bacteria y otras fuentes, como desde la tierra de hojas. Además, la invasión y replicación intracelular de *Legionella pneumophila* dentro de los protozoos en el medio ambiente, también juega un papel fundamental en la transmisión de la legionelosis.

L. pneumophila causa aproximadamente el 90% de todos los casos notificados de legionelosis y exhibe una amplia gama de hospedadores protozoarios que abarcan múltiples filos, desde *Amoebozoa* (amebas) a *Percolozoa* (excava) a *Ciliophora* (protozoos ciliados), aunque es el agua el principal reservorio de legionelas y las bacterias se encuentran distribuidas mundialmente en diferentes ambientes de agua dulce. *Legionella spp.* puede sobrevivir en un amplio intervalo de condiciones físico-químicas, como por ejemplo a un

rango amplio de temperaturas de entre 25° y 42° C, con una temperatura óptima de crecimiento de 35 °C (1), lo que le otorga resistencia en diferentes climas. Esta resistencia en el ambiente se ha acrecentado por su capacidad de formar biofilms, lo que le ha permitido colonizar los sistemas de abastecimiento de agua de las ciudades, sistemas de aire acondicionado, o permanecer en ambientes nosocomiales. Dicha situación se ha convertido en una inquietud importante para el personal y profesionales de la salud pública y en las personas involucradas en el mantenimiento de los sistemas de agua, y labores asociadas con la nebulización.

Es probable que la cifra de casos por la especie *L. pneumophila* pueda estar elevada, debido a que la mayoría de las pruebas de diagnóstico son específicas para esta especie, más que a las otras especies del género. Cabe destacar que las mejoras en las pruebas de diagnóstico, como el análisis de antígenos en orina (específico para *L. pneumophila* serogrupo 1), han provocado inadvertidamente una disminución en el uso de cultivos microbiológicos, pruebas serológica, entre otras, lo que ha ocasionado una vigilancia incompleta de la legionelosis, por ausencia en la detección de otras especies del género.

Con relación al tratamiento, históricamente se ha utilizado la eritromicina como tratamiento de elección, sin embargo, con el paso de los años se ha cuestionado su indicación por la aparición de tratamientos nuevos y con menos efectos secundarios asociados. Es de vital importancia un diagnóstico oportuno de la infección por legionelas, con el fin de iniciar un tratamiento lo más precozmente posible, esto debido a que el retraso en la administración se relaciona con un peor pronóstico.

Por otro lado, la prevención es fundamental para evitar la legionelosis, aunque debido a la ubicuidad del microorganismo hace muy difícil su control, especialmente en la comunidad, donde las potenciales fuentes de infección son muy diversas. En el ambiente hospitalario se aconsejan medidas de desinfección complementarias, para evitar diseminación y brotes nosocomiales de neumonía, infección que puede terminar con un desenlace fatal.

El objetivo de esta revisión es abarcar las principales características en diversos ámbitos del género *Legionella*, como por ejemplo; taxonomía, importancia clínica, diagnóstico y tratamientos asociados a las enfermedades que ocasiona en los seres humanos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- 1.1. Realizar una revisión bibliográfica actualizada respecto a los principales aspectos patogénicos, clínicos y de diagnóstico del género *Legionella*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.2. Conocer las principales características del género, entre ellas la taxonomía, morfología y características bioquímicas de *Legionella spp.*
- 1.3. Describir los principales mecanismos de patogenicidad y virulencia que expresan las especies de importancia clínica de este género.
- 1.4. Analizar las principales rutas de transmisión y ecología de las bacterias del género *Legionella*.
- 1.5. Identificar la importancia clínica del género *Legionella* y los principales métodos diagnósticos para el aislamiento e identificación de las especies patógenas en el ser humano.
- 1.6. Revisar los tratamientos que se usan con mayor frecuencia en clínica, en conjunto con la resistencia y sensibilidad a antibióticos, además de medidas profilácticas para evitar la infección.

METODOLOGIA DE BÚSQUEDA Y ORGANIZACIÓN DE LA INFORMACIÓN

En ésta revisión bibliográfica se realizó una búsqueda e investigación acerca de los aspectos más relevantes del género *Legionella*. Por esta razón, se consultó en diferentes bases de datos como: Scopus, Scielo, PubMed, Web of Science, etc., con el propósito de encontrar información fehaciente y actual con respecto al tema en análisis. En dichas búsquedas se usó palabras claves como: *Legionella*, Legionelosis, *Legionella pneumophila*, Fiebre de Pontiac, etc.

MARCO TEÓRICO

1. INTRODUCCIÓN AL GÉNERO *LEGIONELLA*.

1.1. Taxonomía del Género *Legionella*.

La familia *Legionellaceae* está formada por un solo género; *Legionella* (ver tabla N°1), que en estudios recientes donde se utilizan análisis de ARNr 16S confirman a la familia *Legionellaceae* como un único subgrupo monofilético (no muestran divisiones discretas y si la familia se dividiera, se crearían muchos géneros con solo una o dos especies) dentro de la subdivisión gamma-2 de las Proteobacterias (2).

Los genomas de la subespecie *L. pneumophila spp. Philadelphia* (*L. pneumophila Philadelphia*, un aislado del primer brote de la enfermedad informado en 1976) constan de 3,4 a 3,5 mega pares de bases (mbp) con una composición de 38% de nucleótidos G y C en promedio. Del complemento total de genes, aproximadamente el 60% tiene similitudes detectables con genes de otras especies completamente secuenciadas (3).

Tabla N°1: Taxonomía del género *Legionella*. Fuente: Elaboración propia Escobar, C. (2021).

Dominio	Bacteria
Linaje	<i>Gamma Proteobacteria</i>
Orden	<i>Legionellales</i>
Familia	<i>Legionellaceae</i>
Género	<i>Legionella</i>

El género *Legionella* posee más de 60 especies hasta el momento, entre las cuales se conocen más de 20 especies patógenas de *Legionella* las que difieren en su capacidad para infectar a

los huéspedes y causar enfermedades de graves a leves en los seres humanos (4). En la tabla N° 2 se muestran las especies asociadas a enfermedad en orden cronológico según la fecha de aislamiento e identificación, y con la cantidad de serogrupos asociados a cada cepa.

Filogenéticamente, la especie más cercana a la familia *Legionellaceae* es *Coxiella burnettii*, el agente etiológico de la fiebre Q. Estos organismos tienen estilos de vida intracelulares similares y pueden utilizar genes comunes para infectar a su huésped (2).

La especie característica del género es *Legionella pneumophila*, correspondiente a la primera bacteria del género en describirse que es también hoy en día la especie responsable de casi el 95% de los casos de enfermedad del legionario diagnosticados a nivel mundial (5). El serogrupo de esta cepa más asociado a infección a sido el serogrupo 1, aunque existen otros serogrupos del género que ocasionan cuadros clínicos severos, que por lo general ocurren en pacientes inmunodeprimidos.

Las especies más aisladas del género además de *Legionella pneumophila*, en pacientes durante el 2014 en Europa son (6):

- ❖ *Legionella longbeachae* (2%)
- ❖ *Legionella micdadei* (1%)
- ❖ *Legionella bozemanii* (< 1%)
- ❖ *Legionella macaechernii* (< 1%)
- ❖ *Legionella sainthelensi* (< 1%)
- ❖ Otras especies de *Legionella* (< 1%)
- ❖ Especies no identificadas (1%) (7).

Existen algunas legionelas que no crecen en los medios convencionales para el crecimiento de *Legionella* y pueden cocultivarse y aislarse con sus hospederos protozoarios, a aquellas se le ha denominado patógenos amebianos similares a *Legionella* (LLAP) (2).

Las especies de la familia forman un taxón fenotípico coherente, que se identifica fácilmente por los requisitos de crecimiento *in vitro* y los componentes de la pared celular. El análisis filogenético de las secuencias del gen ARNr 16S también apoya esta opinión. La clasificación a nivel de género ha sido controvertida; la mayoría de los investigadores que apoyan un solo

género, *Legionella*, pero otros han propuesto la división en tres géneros: *Legionella*, *Tatlockia* y *Fluoribacter* (8).

Tabla N°2: Especies y serogrupos de *Legionella* asociadas a enfermedad. *Fuente:* adaptado de Fields BS, Benson RF, Besser RE (2002) y Garrity y Lilburn (2008)

Especies	N° de serogrupos	N° serogrupos asociado a enfermedad	Año de detección
1. <i>L. pneumophila</i>	15	15	1979
2. <i>L. bozemanii</i>	2	2	1980
3. <i>L. dumoffii</i>	1	1	1980
4. <i>L. gormanii</i>	1	1	1980
5. <i>L. micdadei</i>	1	1	1980
6. <i>L. longbeachae</i>	2	2	1982
7. <i>L. jordanis</i>	1	1	1982
8. <i>L. wadsworthii</i>	1	1	1983
9. <i>L. oakridgensis</i>	1	1	1983
10. <i>L. feeleii</i>	2	2	1984
11. <i>L. sainthelensi</i>	2	2	1984
12. <i>L. maceachernii</i>	1	1	1985
13. <i>L. hackeliae</i>	2	2	1985
14. <i>L. erythra</i>	2	1 ¹	1985
15. <i>L. parisiensis</i>	1	1	1985
16. <i>L. anisa</i>	1	1	1985
17. <i>L. birminghamensis</i>	1	1	1988
18. <i>L. cincinnatiensis</i>	1	1	1989
19. <i>L. tucsonensis</i>	1	1	1990
20. <i>L. lansingensis</i>	1	1	1994
21. <i>Legionella busanensis</i>	-	-	2003
22. <i>Legionella drancourtii</i>	-	-	2004
23. <i>Legionella dresdenensis</i>	-	-	2010

24. <i>Legionella cardiaca</i>	-	-	2012
25. <i>Legionella massiliensis</i>	-	-	2012
26. <i>Legionella saoudiensis</i>	-	-	2016
27. <i>Legionella thermalis</i>	-	-	2016

¹ El serogrupo 2 de *L. erythra* se ha asociado con enfermedades humanas.

Se ha utilizado una amplia gama de técnicas inmunológicas, bioquímicas y moleculares para tipificar a las especies del género y sin duda han tenido un valor considerable para dilucidar la epidemiología de la legionelosis. Se han preparado antisueros producidos en conejos contra todas las especies y serogrupos de *Legionella* y se han utilizado en el laboratorio de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) para identificar la mayoría de las cepas de *Legionella* en una prueba de aglutinación en portaobjetos (2).

1.2.Morfología y características bioquímicas.

Las legionelas son bacilos móviles Gram negativo delgados y pleomorfos y su longitud oscila entre 0,3 a 0,9 µm de ancho y desde 1,5 a 15 µm de largo. Son catalasa positivo, con flagelos polares o laterales (9), (excepto *L. oakridgensis*), y en ellas se ha demostrado la presencia de fimbrias y de una estructura polisacárida ácida extracelular (10). Los microorganismos aparecen generalmente como cocobacilos cortos en los tejidos, aunque son muy pleomorfos en los medios artificiales.

La mayoría de las cepas del género licuan la gelatina. La reacción de oxidasa es variable (generalmente positiva), mientras que las reacciones de reducción de nitratos, ureasa y utilización de carbohidratos son negativas (2). Existen estudios que demuestran que la bacteria puede crecer en perfectas condiciones con presencia de CO₂ (capnofilia).

La tabla N°3, resume las características bioquímicas de mayor relevancia en las dos especies mayormente aisladas.

Tabla N°3: Diferencias entre las características bioquímicas de *L. pneumophila* y *L. longbeachae*. Fuente: Adaptado de Brenner, D. (1985)

	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella longbeachae</i>
Crecimiento en agar sangre	-	-
Crecimiento en agar BCYE	+	+
NO₃ – NO₂	-	-
Ureasa	-	-
Ácido a partir de glucosa	-	-
Licuefacción de gelatina	+	+
Hidrólisis del hipurato	+	+
Movilidad	+	+
Oxidasa	+ o +/-	+
β-lactamasa	+	+/-
Autofluorescencia	-	-

Debido a que se tiñen débilmente con la tinción de Gram (ver figura N° 1), se utiliza la tinción de material citológico con nitrato de plata para favorecer la visualización microscópica (por ej., tinción plata de Dieterle y Warthin-Starry) (11). La mejor manera de demostrar *Legionella spp.* es mediante tinción con anticuerpos inmunofluorescentes monoclonales o policlonales. *Legionella micdadei* es débilmente resistente a los ácidos mediante tinción de Ziehl-Nielsen (12).

Desde el punto de vista metabólico es poco sacarolítica. Los aminoácidos son su principal fuente de energía, siendo fastidiosa para su aislamiento *in vitro* ya que requieren hierro y cisteína (13).

Una de las características de este microorganismo, es que es una bacteria capaz de sobrevivir en un amplio intervalo de condiciones físico-químicas, multiplicándose entre 20 °C y 45 °C, destruyéndose a 70 °C, siendo su temperatura óptima de crecimiento de 35 °C a 37 °C (2). Las legionelas producen un compuesto extracelular soluble en agua que presenta una

fluorescencia de color amarillo verdoso al exponerse a la luz ultravioleta; varias especies exhiben autofluorescencia roja, blanca o azul intracelular. La búsqueda del pigmento amarillo verdoso y marrón difusible favorece la identificación de *L. pneumophila* (14).

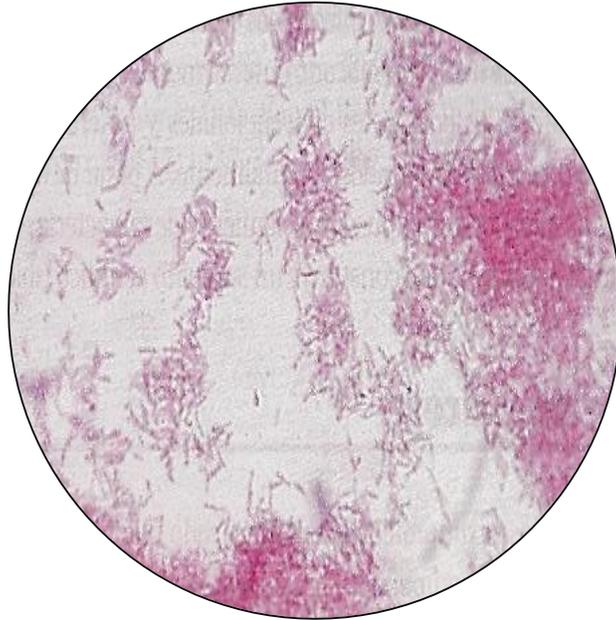


Fig. N° 1: Tinción de Gram de *Legionella pneumophila*. Crece en agar tamponado con extracto de levadura de carbón. Obsérvense las formas pleomorfas características de esta bacteria. *Fuente:* Tomado de: Patrick R. Murray, Ken S. Rosenthal, Michael A. Pfaller (2006).

En general, las características fenotípicas son de utilidad limitada para diferenciar especies. En el laboratorio de microbiología clínica, la prueba directa de anticuerpos fluorescentes (DFA) de los aislamientos permite una rápida identificación de las especies. El análisis del ARNr 16S, el contenido de ubiquinona o los perfiles de ácidos grasos de la pared celular son métodos fiables de especiación, pero éstos generalmente no están disponibles para los laboratorios clínicos (15).

Esta bacteria es un bacilo aerobio estricto que se puede cultivar, pero no en los medios de cultivo clásicos de un laboratorio como Agar Sangre y McConkey, sino, que se debe recurrir

a otros medios de recuperación considerando que es una bacteria exigente desde el punto de vista nutritivo.

A fines de la década de 1970, Feeley y Gorman prepararon un nuevo medio de agar, cisteína FG agar-hierro, con clorhidrato de L-cisteína y pirofosfato férrico soluble, mientras que Feeley et al. modificó el medio reemplazando el hidrolizado de ácido de caseína con extracto de levadura y agregando carbón activado como eliminador de radicales y peróxidos y el medio de agar con extracto de levadura de carbón (CYE) resultante mejoró el crecimiento de *Legionella spp.* Posteriormente, Pasculle et al. suplementado el medio CYE con tampón de ácido N- (2-acetamido) -2-aminoetanosulfónico (ACES), obteniendo de esta manera agar tamponado con extracto de levadura de carbón vegetal (BCYE, ver figura N°2) que, en condiciones aeróbicas, permitió una mejor recuperación de *Legionella* y Edelstein aumentaron aún más la sensibilidad de este medio al agregar α -cetoglutarato (es decir, agar BCYE α) (16).



Fig. N° 2: BCYE-Agar sin L-Cisteína para *Legionella*. Agar de confirmación de *Legionella*, BCYE α y BCYE α sin cisteína, se utilizan para la confirmación de colonias previamente aisladas en agar GVPC. *Fuente:* Tomado de BIOSER, Barcelona (2021)

En este medio BYCE, el que corresponde al medio primario (Buffered charcoal yeast extract, suplementado con α -cetoglutarato) pueden identificarse, porque crecen lentamente en un período de 3 a 7 días en el medio (11). Las colonias de *Legionella* son lisas con un borde entero, tienen un aspecto granular, como “polvo de vidrio” y a veces presentan un brillo azul-verdoso o rosapúrpura, con un aspecto cristalino característico. Aunque se pueden identificar las colonias individuales cuando éstas tienen un tamaño que lo permite, es preferible recuperar del cultivo primario las colonias sospechosas de ser *Legionella spp.*, mediante subcultivo en BCYE α y BCYE α sin cisteína. Ello permite disponer de crecimiento suficiente para realizar los ensayos necesarios para su identificación y evita el riesgo de perder las colonias sospechosas por contaminación de los cultivos primarios durante la incubación prolongada. Además permite su conservación para realizar estudios posteriores (16, 17). El medio para *Legionella* BCYE-Agar sin L-Cisteína, tiene un periodo de validez de 26 semanas, en una temperatura de almacenamiento de 6-12° C, con un pH de 6.9 ± 0.2 .

Más recientemente, la nueva edición de ISO 11731 ha propuesto el uso de tres tipos diferentes de medios selectivos para detectar especies de *Legionella*: agar GVPC o MWY para muestras de agua con una alta concentración de microbiota de fondo y agar BCYE α + AB para muestras con una baja concentración de microorganismos interferentes (18).

Se han desarrollado numerosos medios selectivos basados en diferentes agentes inhibidores para limitar el desarrollo de microbiota interferente que puede reducir o inhibir la recuperación de estas bacterias, dado a la presencia de microbiota bacteriana contaminante en muestras de agua frecuentemente reduce la recuperación de *Legionella spp.* Entre ellos se destacan el agar GVPC (Agar glicina vancomicina polimixina y cicloheximida), un medio BCYE α suplementado con glicina, vancomicina, polimixina B y cicloheximida (16).

El agar GVPC la incubación sugerida para las placas es de 36°C con CO₂ al 2,5% durante 10 días. Las placas se comprueban generalmente los días 2, 3, 5 y luego al final del período de incubación (17).

Otro medio de gran utilidad es el medio modificado Wadowsky - Yee (MWY), otro medio BCYE α que contiene, a diferencia del medio GVPC, glicina, de polimixina, vancomicina, anisomicina y los colorantes azul bromotimol y violeta bromocresol, que tiñen las colonias

y ayuda en la identificación de los organismos (16). La tabla N° 4 muestra los componentes de los tres medios más ampliamente utilizados.

La adición de colorantes facilita la diferenciación entre los miembros de la familia *Legionellaceae*. En este medio, *Legionella pneumophila* crece como colonias relativamente planas de color verde pálido, mientras que *Tatlockia micdadei* (gen. Nov., Comb. Nov., Agente de neumonía de Pittsburgh) produce colonias de color gris azulado. *Fluoribacter* spp. (nov. gen., organismos atípicos similares a *Legionella*) desarrolla colonias relucientes que eran de un verde más brillante que las de *L. pneumophila* (19).

Según la literatura, estos tipos de medios son muy difíciles de preparar, almacenar y probar, ya que las diferencias menores en el pH, el contenido de cationes y la composición del agar pueden influir en gran medida en las tasas de crecimiento, la eficiencia de la siembra en placa y la formación de colonias. La detección es ahora, más que nunca, esencial para lograr un grado satisfactorio de comparabilidad entre los resultados de las pruebas de agua de diferentes laboratorios (20).

Tabla N°4: Medios de cultivo para *Legionella* spp. Fuente: Adaptado de Procedimientos en Microbiología Clínica: Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (2005).

Agar BCYE α (Buffered charcoal yeast extract, suplementado con cetoglutarato)	BMPA (BCYE α con suplementado con α -polimixina B, cefamandol y anisomicina)	MWY (Wadowsky – Yee)
<u>Composición por litro:</u> -ACES buffer 10 g -KOH 2,8 g -Carbón activo 2 g -Extracto de levadura 10 g -Agar 14 g - α -Cetoglutarato 1 g	Este medio es idéntico al BCYE α excepto que se le adiciona un suplemento de tres antibióticos, polimixina B (80IU/ml), cefamandol (4ug/ml) y anisomicina (80ug/ml)	Glicina 0.3% Polimixina B 50 UI/ml Vancomicina 1ug/ml Anisomicina 80ug/ml Azul de bromotimol Violeta de bromocresol

-L-Cisteína HCl 0,4 g en 10 mL		
-Pirofosfato férrico 0,25 g en 10 mL		
-Agua destilada Hasta 1 litro		

En cuanto a las condiciones de incubación, una vez secos los inóculos a temperatura ambiente, se extenderán por toda la placa con ayuda de un asa bacteriológica. Todas las placas inoculadas serán incubadas a 36°C, en aerobiosis y en condiciones de humedad, durante 12-15 días. Para conseguir las condiciones de humedad se puede colocar en la base del incubador un recipiente con agua destilada conteniendo una pequeña cantidad de sulfato de cobre (renovar esta solución 1 ó 2 veces por semana). La incubación en una atmósfera de 2,5-5% de dióxido de carbono (CO₂) puede ser beneficioso para el crecimiento de algunas especies de *Legionella* (17).

En cuanto al cultivo de *L. longbeachae*, se destaca que no crece en Agar Sangre, sólo en Agar BCYE, con carbón activado (detoxificante del medio), L-cisteína (extracto de levadura). También se pueden aislar desde el medio BCYE Modificado (α -cetoglutarato, antibióticos y antifúngicos), donde crece a partir de las 48 hrs. de incubación, a 37 °C (21).

Con relación a la identificación de las colonias, se seleccionan al menos tres colonias características de la bacteria por cada muestra inoculada y subcultivar paralelamente en BCYE α y BCYE α sin cisteína. Incubar a 36°C durante al menos 2 días. Se consideran *Legionella spp.* aquellas colonias con crecimiento en BCYE α y sin crecimiento en BCYE α sin cisteína (o ausencia de crecimiento en agar sangre). *Legionella oakridgensis* es la única especie que no requiere cisteína en el aislamiento primario, aunque sí lo requiere en sucesivos subcultivos. En general, una colonia de *Legionella spp.* en subcultivo crece en BCYE α a las 48 horas de incubación a 36°C, aunque algunas especies pueden requerir una incubación más prolongada y la presencia de CO₂ (2,5- 5%). A las 48-72 horas el crecimiento aparecerá confluyente en algunas zonas y con pequeñas colonias aisladas en otras (16, 17).

2. PATOGENICIDAD Y MECANISMOS DE VIRULENCIA

La patogenia de la infección en humanos vulnerables inicia a través de las redes de agua, donde el microorganismo accede a equipos tales como torres de refrigeración, sistemas centralizados de agua caliente, equipos de aerosol-terapia y sistemas de agua climatizada entre otros. A partir de estas instalaciones y entre otras, *Legionella spp.* puede infectar al hombre por inhalación de microaerosoles contaminados con la bacteria o microaspiración de agua contaminada con el microorganismo. Este microorganismo crece en los pulmones, pero no se disemina con facilidad debido a que es incapaz de soportar temperaturas altas (por encima de 35 °C) (13). Entonces, los microorganismos flagelados atraviesan la capa mucosa del epitelio respiratorio inferior (11), colonizan los macrófagos alveolares (unión de superficie mediante fimbrias específicas) que las fagocitan, e inician una multiplicación activa, dada por su alta capacidad de sobrevivencia intracelular, en base a la inhibición de la formación del fago-lisosoma y por la generación de distintas enzimas mediante la activación de genes de virulencia. El ciclo de replicación 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 que la bacteria se una a los receptores CR3 del complemento de los fagocitos mononucleares, después de lo cual los microorganismos entran en los mismos mediante un proceso de endocitosis (13). La característica principal de la patogenia de las legionelas es su capacidad para multiplicarse intracelularmente (2). Así como las bacterias del género pueden colonizar protozoos, también pueden desarrollar su ciclo de vida residiendo dentro de un fagosoma único que no se fusiona con los lisosomas ni se vuelve muy ácido, dentro de los macrófagos alveolares y monocitos. Los fagosomas tradicionalmente maduran en vacuolas digestivas a través de la vía endocítica. Esto implica una interacción progresiva con la red endosómica, que conduce a la acidificación de la vacuola y a la degradación de la mayoría de los microbios (22). Se sabe que la modulación de los marcadores de la célula huésped es importante para la biogénesis de la vacuola replicativa. La morfología específicamente alterada de este compartimento es similar en

células de protozoos y mamíferos y requiere el sistema de secreción bacteriano Dot / Icm tipo IV (3).

El método de captación de las bacterias se ha descrito como fagocitosis en espiral tanto en macrófagos como en amebas de vida libre. Los microorganismos proliferan en su vacuola intracelular y producen enzimas proteolíticas, fosfatasa, lipasa y nucleasa, que matan la célula anfitriona cuando se lisa la vacuola (13). Este modo de entrada limita el estallido oxidativo del fagocito y se ha propuesto que *Legionella* inhibe la generación de superóxido mediante la modulación descendente de los isotipos de la proteína quinasa C α y β (23).

Si bien algunas características son exclusivas de las interacciones entre *L. pneumophila* y células huésped específicas, los mecanismos primarios de infección parecen ser los mismos que en los protozoos. En todos los modelos, tras la internalización por parte de la célula huésped, la vacuola bacteriana se asocia transitoriamente con las mitocondrias y luego adquiere características del retículo endoplásmico (RE) (24). Los fagosomas tempranos (5 min. después de la infección) carecen de moléculas de clase I y clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), fosfatasa alcalina y otras proteínas de membrana. En la fase de registro medio de *Legionella* se replica por fisión binaria con un tiempo de duplicación de aproximadamente 2 horas. Esto da como resultado una célula huésped que está llena de bacterias. Durante la fase de replicación tardía, el fagosoma de *Legionella* se fusiona con los lisosomas sin consecuencias perjudiciales para las bacterias intracelulares (25). Después de la explotación del hospedador, *Legionella* entra en la fase de crecimiento post-exponencial en la que se expresan los rasgos de motilidad y virulencia que promueven la transmisión a un nuevo hospedador.

La respuesta a la infección por parte del hospedador es una respuesta de tipo celular, mediada por linfocitos T helper (CD4+) (11). Los mecanismos de defensa del hospedador se inician con la acción de la barrera mucociliar, con la acción de los cilios y células epiteliales. Posteriormente se activa la respuesta inflamatoria, la producción de anticuerpos humorales y la respuesta inmunitaria celular. Así la producción de citocinas activa a los macrófagos con el fin de potenciar la muerte bacteriana (26).

Etapas del mecanismo de infección:

- a) Adhesión del microorganismo a los receptores de superficie de las células fagocíticas
- b) Endocitosis
- c) Vacuolización, escape del ataque bactericida
- d) Formación de la vacuola replicativa
- e) Multiplicación intracelular
- f) Liberación de bacterias y muerte de la célula huésped.

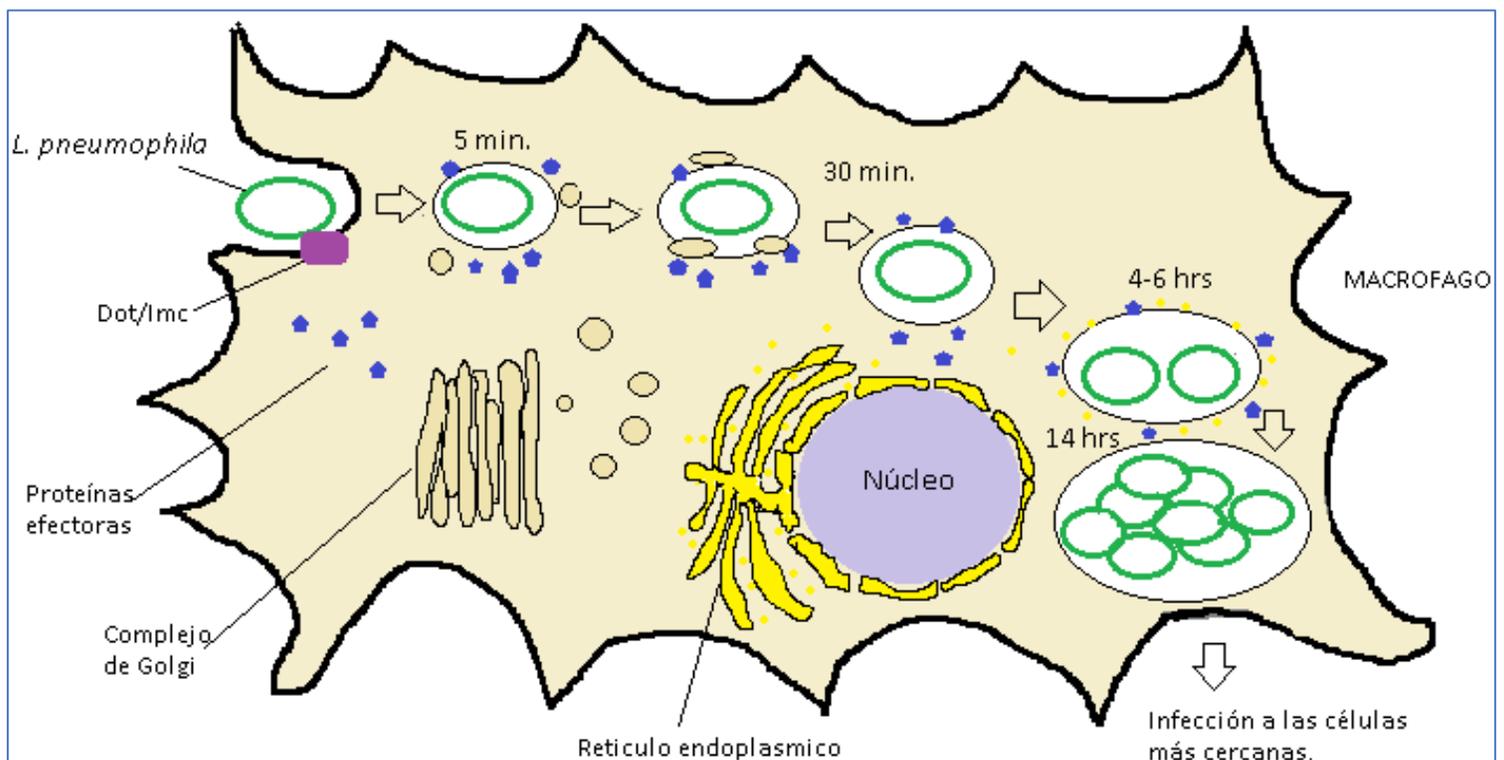


Fig. N°3: Esquema del mecanismo infeccioso de *Legionella spp.*, en un macrófago alveolar. Se observa la fagocitosis de la bacteria y las etapas que ocurren hasta la liberación de los microorganismos. *Fuente:* Elaboración propia Escobar, C. (2021).

La etapa final del ciclo infeccioso es la muerte de la célula huésped y la liberación de la bacteria. *L. pneumophila* mata a su célula huésped por apoptosis o necrosis mediada por una actividad formadora de poros o ambas. En los macrófagos y las células epiteliales alveolares,

L. pneumophila induce la apoptosis durante las primeras etapas de la infección. Esta muerte celular programada, que está mediada por la activación de la caspasa-3, se caracteriza por la condensación de la cromatina en el límite nuclear y la escisión del ADN intercromosómico (27, 28). En la fase post-exponencial de crecimiento, causa necrosis de la célula huésped, inducida por una actividad formadora de poros. Por el contrario, la muerte de las células de ameba del huésped no se ha asociado con la apoptosis en estudios que utilizan *Acanthamoeba castellanii* y *Acanthamoeba polyphaga*. Estos estudios sugieren que se utiliza un mecanismo diferente para matar y eliminar las células huésped de mamíferos y protozoos.

Los factores que causan la lesión tisular pulmonar son las citocinas y otros productos reactivos producidos por los PMN y linfocitos T, mientras que el complemento y los elementos celulares correspondientes a la respuesta del huésped provocan la aparición de infiltrados parcheados y difusos en la radiografía de tórax (11).

A lo largo del tiempo evolutivo, la interacción protozoos- *Legionella* puede haber generado un conjunto de rasgos de virulencia que preadaptaron este patógeno para la infección humana. Los factores de virulencia del género *Legionella* no están claramente definidos. Aunque muchas especies pueden colonizar los sistemas de distribución de agua, solo algunas pocas son capaces de producir infecciones (23, 26).

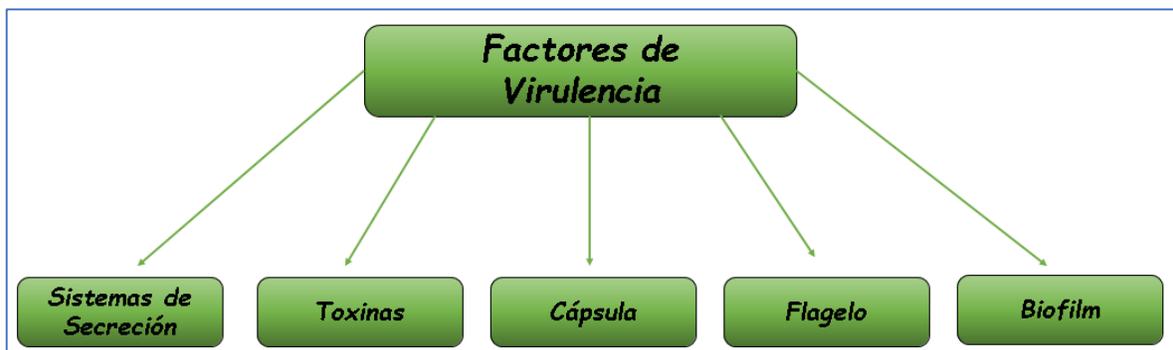


Fig. N° 4: Esquema de los principales mecanismos de virulencia de *Legionella spp.* Fuente: Elaboración propia Escobar, C. (2021).

Al igual que otras bacterias intracelulares como *Coxiella spp.* y *Chlamydia spp.*, *L. pneumophila* alternan entre ciclos bifásicos transmisivos (virulentos) y replicativos (no virulentos) para asegurar la supervivencia bacteriana en ambientes ricos o privados de nutrientes y la transferencia entre diferentes nichos (29).

L. pneumophila posee muchos de los determinantes bacterianos tradicionales que son importantes para la patogenicidad en otras bacterias, incluidos lipopolisacáridos (LPS), flagelos, pili, un sistema de secreción de tipo II (T2SS) y proteínas de la membrana externa. Sin embargo, la capacidad de manipular los procesos de la célula huésped desde dentro de una vacuola intracelular requiere un arsenal único. Esto incluye un número excepcional y una amplia variedad de sistemas de secreción para el suministro rápido y eficaz de moléculas efectoras en la célula huésped fagocítica, lo que subraya la importancia de la secreción de proteínas para este patógeno. Entre ellos, el sistema de secreción de tipo IV (T4SS) que transloca alrededor de 200 proteínas efectoras, incluyendo muchas proteínas con similitud eucariota, en la célula huésped, en las que actúan sobre diversas vías de la célula huésped (20). Esto también es válido para *L. longbeachae* (30).

Con relación a las proteínas efectoras, las proteínas SidJ, RalF, VipA, VipF, SidC, YlfA y LepB que contribuyen al tráfico o reclutamiento y retención de vesículas a las vacuolas de *L. pneumophila* se conservan en *L. longbeachae*, pero VipD, SidM / DrrA y LidA que también interfieren con estos eventos están ausentes en el genoma de *L. longbeachae*; sin embargo, VipD y SidM / DrrA tampoco están presentes en todos los genomas de *L. pneumophila* secuenciados.

El factor de virulencia de *Legionella* Mip (potenciador de la infectividad de los macrófagos) es una toxina que contribuye a la diseminación bacteriana dentro del tejido pulmonar infectado y al bazo. La proteína Mip, que pertenece a la familia de enzimas de proteínas de unión a FK506 (FKBP), se une específicamente al colágeno IV y a células epiteliales pulmonares. Es la responsable de la supervivencia intracelular de este microorganismo, y además posee un rol importante para la adherencia e invasión de nuevas células huésped (31).

En el genoma de *L. longbeachae* se han identificado dos grupos de genes que codifican proteínas que se prevé que estén involucradas en la producción de lipopolisacárido (LPS) y / o cápsula. El hallazgo de que *L. longbeachae* podría estar encapsulado fue corroborado por análisis de microscopía electrónica que muestra una estructura en forma de cápsula rodea a la bacteria (30).

Legionellaceae son habitantes ubicuos de ambientes acuáticos. Algunas *Legionellaceae* son móviles y su movilidad es importante para moverse en los hábitats. La motilidad se puede

considerar como un factor de virulencia potencial, como ya se ha demostrado en varios patógenos humanos. Los genes del sistema flagelar, genes reguladores y estructurales, están estructurados en niveles jerárquicos descritos como regulón flagelar. Su expresión está modulada por diversos factores ambientales. Para *L. pneumophila* se demostró que la expresión de genes del regulón flagelar está modulada por la temperatura y la fase de crecimiento reales. Especialmente, se sabe que las especies de *Legionella* que presentan flagelos expresan genes durante la fase transmisiva del crecimiento que están involucrados en la expresión de rasgos de virulencia. Se ha demostrado que el factor sigma-28 alternativo es parte del vínculo entre la expresión de virulencia y la motilidad. Recientemente, se ha descrito que *Legionella micdadei* y *Legionella fallonii* contienen un segundo sistema flagelar parcial putativo (32). A diferencia de *L. pneumophila*, *L. longbeachae* no codifica flagelos, lo que proporciona una posible explicación de las diferencias en la susceptibilidad a la infección entre los dos patógenos (30).

La motilidad en las especies de *Legionella* capaces de infectar a humanos, puede ser crucial para la diseminación dentro de los pulmones de los pacientes, ya que se detectaron formas flageladas de *L. pneumophila* en espacios alveolares (33). Recientemente, se publicó que las cepas de *L. feelei* que causan la enfermedad del legionario están flageladas, mientras que las cepas de *L. feelei* que causan la fiebre de Pontiac no están flageladas (34). La mayoría de las especies de *Legionella* están flageladas pero no todas las patógenas tienen un regulón flagelar completo.

En relación con hábitats acuáticos favorables y posibles huéspedes protozoarios, especialmente la motilidad impulsada por los flagelos de algunas *Legionella spp.* es una característica importante necesaria para moverse, para encontrar nuevos huéspedes y para formar quizás incluso biopelículas (35).

Con relación a la formación de biopelículas, éstas han tomado mayor relevancia en el último periodo, permitiendo a las legionelas, adherirse a la pared interior de las tuberías, desde donde pueden ingresar al agua y contaminarla (36). Esto se puede lograr formando una matriz extracelular (MEC) que se compone principalmente de agua, exopolisacáridos, proteínas, lípidos, ADN y ARN, y compuestos inorgánicos, donde los patrones de las colonias siguen patrones arquitecturales dinámicos y complejos basados en la estratificación (37). En el

estrato superior de las colonias se identifica una subpoblación de células bacilares que probablemente producen gran cantidad de matriz extracelular. Este fenómeno es especialmente intenso en las colonias de *L. bozemanii*, en las que el estrato superficial recuerda una cubierta protectora, similar a la capa córnea de un epitelio estratificado, posibilitando, probablemente, el desarrollo de microambientes concretos en el interior de la colonia (37, 38). La importancia de este mecanismo patogénico radica en que las poblaciones bacterianas dentro de una biopelícula, a diferencia de sus contrapartes planctónicas, son muy resistentes a la erradicación, ya sea en la naturaleza o en dispositivos médicos y dentales desde donde sirven como fuentes de brotes de la enfermedad del legionario, y es desde ese nicho donde la bacteria es recalcitrante a la mayoría de los agentes antibacterianos (39).

Las señales ambientales también pueden influir en los cambios en el metabolismo de las células de *L. pneumophila* que favorecen la producción y colonización de biopelículas, que pueden ocurrir después de la replicación dentro de los protozoos o independientemente de la infección por protozoos. Otras especies microbianas como *P. aeruginosa* pueden inhibir la colonización de *L. pneumophila*. La presencia de otros microorganismos como *K. pneumoniae* alivia el efecto inhibitorio de *P. aeruginosa* y permite incorporar *L. pneumophila* dentro de las biopelículas. *L. pneumophila* produce un surfactante, que es tóxico para otras especies de *Legionella* y por lo tanto, puede prevenir la incorporación de estas bacterias dentro de las biopelículas. Los parámetros fisicoquímicos, como los cationes divalentes pueden favorecer la colonización del biofilm de *L. pneumophila* mientras que otros factores como la presencia de nanopartículas y cobre pueden dificultar la colonización de *L. pneumophila* (40).

Estudios recientes demuestran que los aislados de *L. pneumophila* de los serogrupos 1, 10 y 12 que se obtuvieron de biopelículas fueron más citotóxicos para las amebas que los brotes de referencia y las cepas epidémicas mundiales, además, los datos iniciales sugieren que *Legionella pneumophila* derivada de biopelículas evade la respuesta inmune innata en los macrófagos (38, 41).

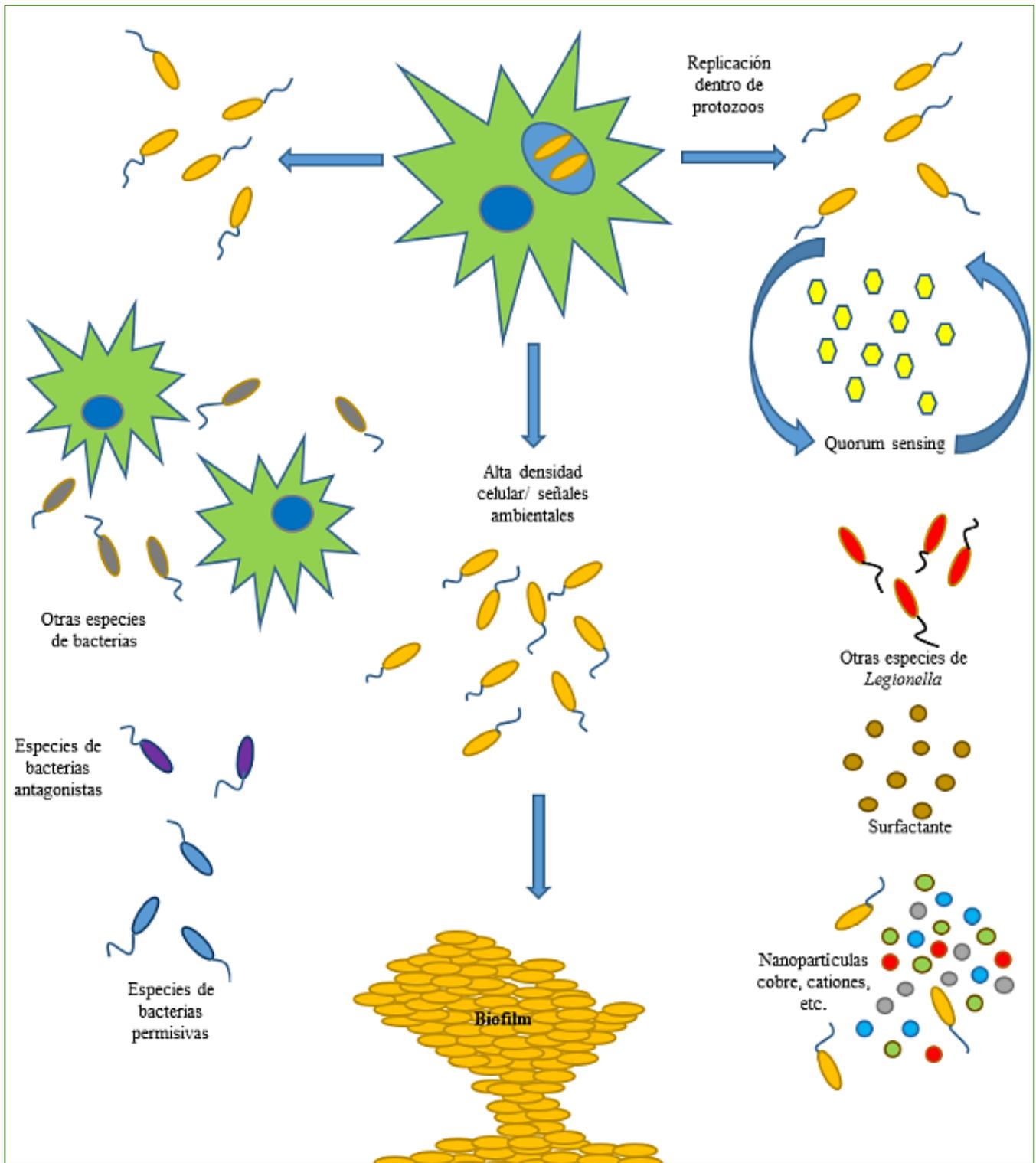


Fig. N° 5: Esquema representativo de la formación de un biofilm por *L. pneumophila*. La presencia de microorganismos como *K. pneumoniae* (permisiva) alivia el efecto inhibitor

de *P. aeruginosa* (antagonista) y permite incorporar a *L. pneumophila* dentro de las biopelículas. *L. pneumophila* produce un surfactante, que es tóxico para otras especies de *Legionella*. Los parámetros fisicoquímicos como los cationes divalentes pueden favorecer la colonización del biofilm de *L. pneumophila* mientras que otros factores como la presencia de nanopartículas y cobre pueden dificultar la colonización de *L. pneumophila*. Fuente: Elaboración propia Escobar, C. (2021).

La capacidad de *L. pneumophila* para crecer dentro de biopelículas producidas por *Klebsiella pneumoniae* o *Pseudomonas aeruginosa* en ambientes acuáticos o húmedos planteó el estudio de su persistencia libre de hospedadores (42).

Debido al estilo de vida intracelular de *L. pneumophila* dentro de los protozoos, es difícil determinar si la resistencia de *L. pneumophila* en las biopelículas ambientales se debe a la estructura de la biopelícula, su asociación con amebas o ambas. Sin embargo, es evidente que la *L. pneumophila* ambiental que se encuentra en las biopelículas es extremadamente resistente al tratamiento con biocida.

3. ECOLOGÍA Y TRANSMISIÓN DE *LEGIONELLA*.

3.1. Ecología de las especies de *Legionella* de importancia clínica

Con relación a su distribución, el agua es el principal reservorio de *Legionella spp.* y las bacterias se encuentran en ambientes de agua dulce en todo el mundo, ya que son bacterias ubicuas, y se encuentran naturalmente en lagos, ríos, arroyos y aguas termales (43, 44). Se han detectado legionelas en hasta un 40% de los ambientes de agua dulce por cultivo y hasta en un 80% de los sitios de agua dulce por PCR. Una única excepción a esta observación es *Legionella longbeachae*, un aislado frecuente de la tierra para macetas. Esta especie es la principal causa de legionelosis en Australia y se presenta en jardineros y personas expuestas a tierra comercial para macetas. Los primeros casos estadounidenses de infección por *L. longbeachae* asociada con tierra para macetas se notificaron en 2000 (8).

Por otro lado, debido a las bajas concentraciones de nutrientes en sus hábitats acuáticos, *Legionella spp.* se ha adaptado a vivir en biopelículas, donde pueden obtener los aminoácidos y las fuentes de carbono que necesitan para sobrevivir, replicarse y protegerse de los cambios de temperatura y el tratamiento con biocidas (9). Esta capacidad de formar biofilm le ha permitido considerarse como un microorganismo crítico, pudiendo aislarse en ambientes diversos como ríos, arroyos, lagos y también en sistemas acuáticos confeccionados por el hombre, a los que se les asocia la mayoría de los cuadros clínicos por esta bacteria, debido a que en los sistemas acuáticos artificiales la temperatura del agua es más alta que la temperatura de los ecosistemas silvestres. Entre estos sistemas artificiales acuáticos se destacan; piscinas, tanques y tuberías de agua, torres de enfriamiento y sistemas de aire acondicionado de edificios de viviendas, oficinas y en centros hospitalarios (45, 46). Durante los últimos años, *Legionella spp.* se ha aislado de cabezales de ducha, grifos, sistemas de agua caliente de hoteles, hospitales y hogares (10), lo que implica que la contaminación de sistemas de agua caliente sigue siendo un desafío ambiental y un desafío persistente para la salud pública.

Se ha descubierto que varios entornos creados por el hombre, en particular los sistemas de aire acondicionado y los sistemas de distribución de agua, actúan como depósitos y amplificadores del microorganismo que producen y dispersan aerosoles. Forman una parte fundamental de una vía eficaz de transmisión y son una fuente frecuente de exposición humana. Otras oportunidades de exposición humana a *Legionella spp.* han identificado a partir de tierra, compost y mezcla para macetas. Aunque esta ruta de transmisión no se comprende completamente, es probable que involucre partículas de polvo en aerosol que contienen la bacteria (47).

Legionella spp. se ha detectado en piscinas, fuentes de agua, unidades dentales, humidificadores, sistemas de distribución de agua potable domésticos, torres de refrigeración, sistemas de agua caliente de hospitales y hoteles, asociado a los microbios residentes como Cianobacterias y *Flavobacterium spp.* contribuyen al crecimiento de *L. pneumophila*. Curiosamente, otras bacterias como *Pseudomonas spp.* y *Staphylococcus warneri* parecen tener un efecto antagónico sobre la proliferación de *Legionella spp.* (15). Por lo tanto, se justifica analizar la interacción microbiana entre *L. pneumophila* y la microbiota residente en el agua y en la biopelícula para comprender completamente su ciclo de vida y proponer mejores estrategias para controlar su crecimiento.

Diversos estudios demostraron que las principales fuentes de legionelas, son los sistemas de distribución de agua potable en grandes edificios como hospitales y hoteles (11), lo que significa un alto riesgo para los pacientes; en especial para aquellos con enfermedades graves, siendo una causa importante de neumonía adquirida en el hospital (12). La presencia de *Legionella spp.* es un grave riesgo para la salud del personal hospitalario y los pacientes, pero la magnitud del problema a menudo no se reconoce.

En las biopelículas, *Legionella spp.* son parte de comunidades microbianas complejas donde están sujetas a la depredación por protozoos (9). Se sabe que la bacteria parasita algunos protozoos, incluidas las amebas. Es más difícil matar la bacteria cuando está asociada con amebas y aún más difícil cuando está asociada con quistes de amebas (13). Se han encontrado amebas portadoras del microorganismo en torres de enfriamiento de un sistema de aire acondicionado, donde se demostró que la exposición de una especie de protozoos a un

desinfectante conducía a su resistencia a otros desinfectantes lo que puede causar un más difícil control de *Legionella spp* (14).

Hasta ahora se conocen cinco géneros de amebas (*Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Hartmannella*, *Vahlkampfia* y *Echinamoeba*) y un género de protozoo (*Tetrahymena*) capaces de soportar el crecimiento intracelular de *L. pneumophila*. Otras especies de legionela muestran un número inferior de huéspedes. Los sistemas de distribución de agua sanitaria frecuentemente se hallan colonizados por *Hartmannella vermiformis*. Las biocapas incorporan algas y microorganismos (flavobacterias y cianobacterias) que se adhieren a las paredes de las conducciones y depósitos de agua (16).

3.2. Transmisión de *Legionella spp*.

El conocimiento con respecto al nicho ecológico de la bacteria proporciona una información de gran utilidad para entender la transmisión de la bacteria. Aunque *Legionella spp.* es una bacteria ampliamente distribuída en ambientes acuáticos, su presencia en un sistema de agua no es suficiente para implicar a una cepa como agente causal de infección. La aparición de la enfermedad depende de una serie de requisitos encadenados que se ven favorecidos por una serie de factores:

Ambientales:

1. Temperatura: con un rango entre 25 y 45 °C, Mayor entre 35 y 37 °C.
2. pH
3. Depósitos biológicos (biofilm): Protozoos, algas, bacterias.
4. Estancamiento del agua: Existencia de zonas muertas, baja velocidad de circulación.
5. Calidad del agua: limpieza, presencia de nutrientes, depósito de sólidos en suspensión, conductividad, turbidez, etc.
6. Tipo superficie en contacto agua: Tipo material (celulosa, madera, etc.), rugosidad, depósitos cálcicos, corrosión.
7. Biocidas.

Aunque el modo de transmisión no se conoce siempre, la evidencia del rol de la inhalación o aspiración de agua aerosolizada (menores de 5 μm) (10) que contienen *Legionella*, es el principal causante. La permanencia de los aerosoles en el aire es corta, ya que presentan una escasa resistencia a la desecación y a los efectos de la radiación ultravioleta. Los aerosoles no alcanzan grandes distancias –unos 200 m- pero se han descrito distancias de hasta 3 Km e incluso 28 Km.

A pesar de que en la población en general la exposición está principalmente ligada a la estancia en hoteles, hospitales y spas, en los trabajadores, se ha asociado a sistemas de agua caliente, sistemas de torre de refrigeración usados en aires acondicionados, refrigeradores industriales utilizados en la lubricación de la maquinaria, la limpieza de las turbinas de los

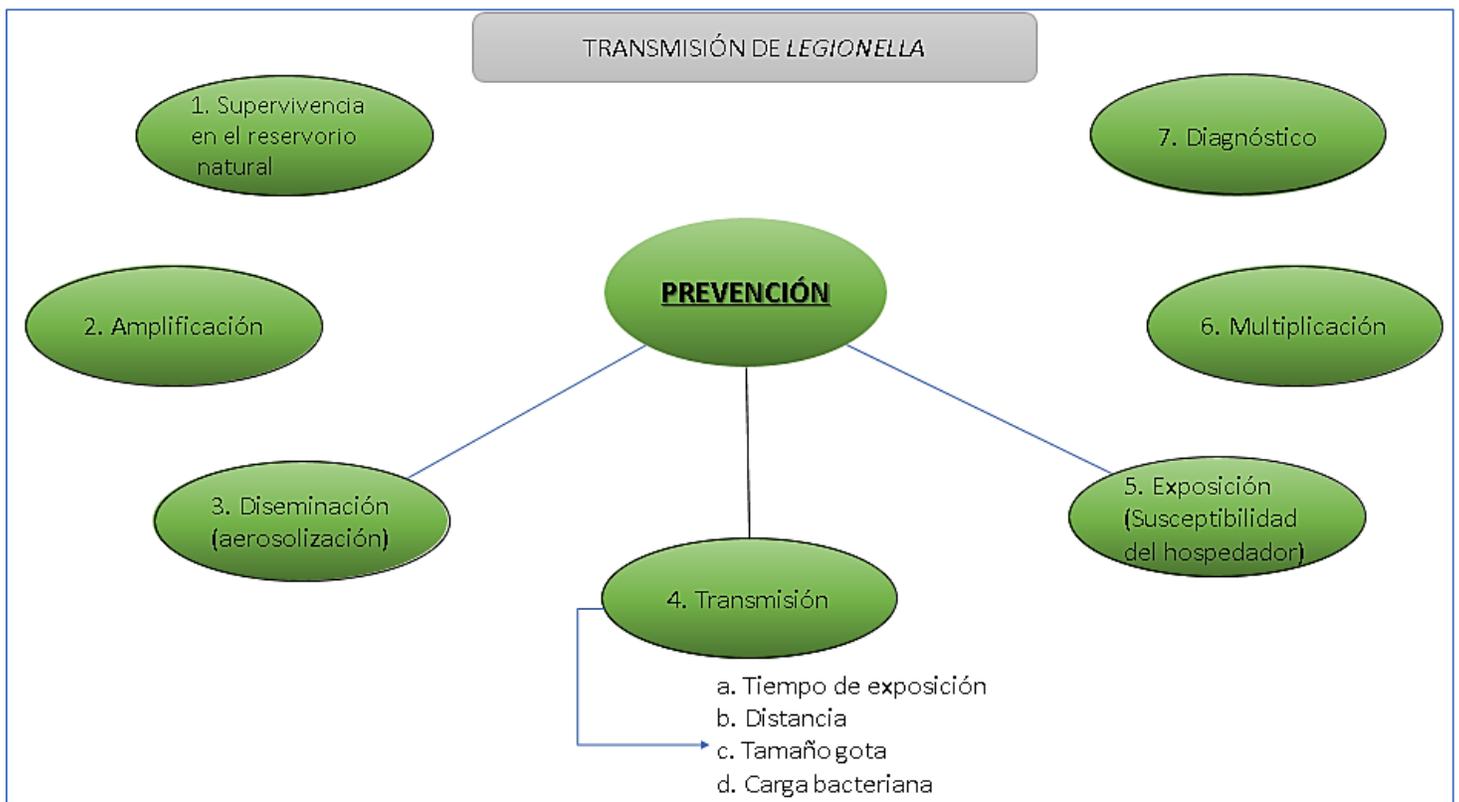


Fig. N°6: Transmisión de *Legionella spp.* Se observan las etapas que deben pasar desde que *Legionella spp.* se encuentra en el reservorio, hasta el diagnóstico. Punto central la transmisión y los factores que la determinan. *Fuente:* Elaboración propia Escobar, C. (2021).

condensadores con aire comprimido y suministro de agua municipal, aunque también se consideran factores de riesgo la exposición a excavaciones y construcciones (48).

Por otro lado, algunos brotes de legionelosis se han asociado con la construcción, y originalmente se creía que la bacteria podría sobrevivir y transmitirse a los humanos a través del suelo. Sin embargo, *L. pneumophila* no sobrevive en ambientes secos, y estos brotes son más probablemente el resultado de una descalcificación masiva de los sistemas de plomería debido a cambios en la presión del agua durante la construcción (2). Por otro lado, se creía que a pesar de la posible gravedad de los casos individuales de enfermedad, la bacteria no se transmitía de persona a persona (49), ni al beber agua, ni ingerir alimentos, pero recientemente se informó el primer caso de una probable transmisión de persona a persona de *L. pneumophila* durante un gran brote en Portugal en 2015 (50), por lo que se define que la transmisión de persona a persona puede ocurrir en casos raros. No hay casos documentados de transmisión zoonótica a pesar de que se han detectado anticuerpos de *Legionella spp.* en el suero de los animales (6).

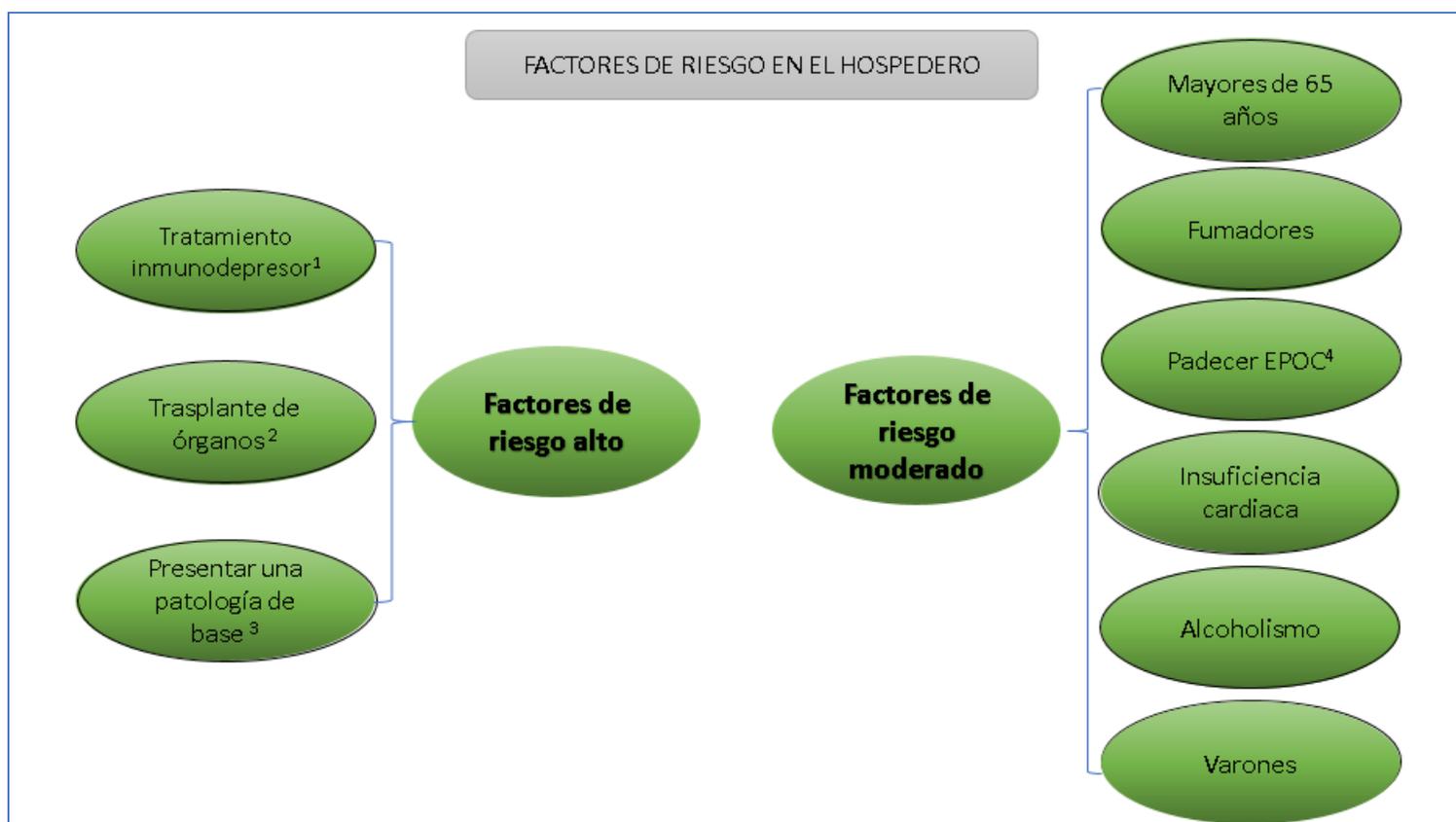
Finalmente podemos decir que la legionelosis es una enfermedad oportunista, dado que excepcionalmente se presenta en personas sanas en las que puede producir infecciones asintomáticas. Para que se produzca infección en el hombre se tienen que dar una serie de requisitos:

- Que el microorganismo tenga una vía de entrada a la instalación.
- Que se multiplique en el agua hasta conseguir un número de microorganismos suficientes como para que sea un riesgo para personas susceptibles.
- Que se disperse en el aire en forma de aerosol a partir del sistema.
- Que sea virulento para el hombre.
- Que individuos susceptibles sean expuestos a aerosoles con la cantidad suficiente de *Legionella* viable.

Estas bacterias son eliminadas del tracto respiratorio mediante el mecanismo mucociliar, de manera que cualquier proceso que altere este mecanismo (por ej., consumo de cigarrillos) incrementa el riesgo de infección (11).

3.3. Factores de riesgo en el hospedero

Los principales factores de riesgo de padecer la enfermedad (en casos en que la salud esté comprometida, la susceptibilidad del huésped aumenta), se ilustran en la figura N° 7, donde se presentan factores de riesgo alto y moderado de infectarse con *Legionella spp.*



¹terapia antirrechazo en enfermos transplantados, en especial con glucocorticoides

²principalmente de riñón, corazón, hígado y pulmón

³padecer de alguna patología de base como: neoplasias, diabetes, quimioterapia, insuficiencia renal terminal.

⁴EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica

Fig. N°7: Factores de riesgo del hospedero. Se observan los principales factores de riesgo alto y riesgo moderado. *Fuente:* Elaboración propia Escobar, C. (2021).

Concluyendo, las especies de *Legionella* se multiplican intracelularmente en muchos tipos de protozoos, y esta relación es fundamental para la ecología del organismo tanto en el medio acuático como en el suelo. Si bien proporcionan un nicho para la replicación de *Legionella*,

las amebas también protegen a *Legionella* de las duras condiciones ambientales. Esta relación aumenta la resistencia de *L.pneumophila* a biocidas, antibióticos, ácido y estrés osmótico y térmico. Además, algunas especies de amebas expulsan vesículas resistentes a los biocidas que contienen un gran número de bacterias *L. pneumophila*, que pueden actuar como agentes transportadores por el aire para la transmisión de la bacteria (24).

4. IMPORTANCIA CLINICA EN HUMANOS

La legionelosis es una de las infecciones atípicas no zoonóticas más importantes que afectan a los seres humanos. La neumonía es la manifestación clínica predominante de la infección por *Legionella spp* en humanos (51). *L. pneumophila* es más patógena para los humanos que otras especies de *Legionella*. Por tanto, el impacto de *L. pneumophila* en la salud pública se refleja en el mayor enfoque de la investigación sobre este organismo. *Legionella bozemanae*, *L. micdadei* y *L. longbeachae* son los siguientes agentes etiológicos más comunes de la enfermedad del legionario y juntos representan aproximadamente del 2 al 7% de las infecciones por *Legionella spp.* en todo el mundo (24).

La neumonía por *Legionella pneumophila* se asocia con una alta morbilidad, como lo demuestra la alta proporción de pacientes que requieren ingreso en la unidad de cuidados intensivos (UCI). Sin embargo, la mortalidad por *Legionella spp* ha disminuido significativamente al darse cuenta de que la terapia temprana y dirigida que cubre a este patógeno, mejora el notablemente el resultado (52).

L. pneumophila es considerada responsable del 1 al 15% de los casos de neumonías adquiridas en la comunidad, del 5 al 10% de neumonías del adulto y del 1% en menores de 15 años (2). Entre los 20.000-30.000 casos de enfermedad del legionario notificados anualmente, aproximadamente el 25% son adquiridos en el hospital (53).

La legionelosis es una enfermedad aguda que presenta dos cuadros bien diferenciados tanto clínica como epidemiológicamente: la enfermedad del legionario y la fiebre de Pontiac, aunque *Legionella* también puede causar otro tipo de enfermedades como heridas raras y otras infecciones pero muy poco frecuentes (54).

La neumonía causada por cualquier especie de *Legionella* se denomina enfermedad del legionario. El brote en Pontiac, Michigan, conocido como "fiebre de Pontiac", tuvo una enfermedad febril aguda pero no tuvo neumonía como en el brote de Filadelfia (12).

4.1.Enfermedad del legionario.

Consiste en un síndrome de neumonía de espectro clínico variable, que puede cursar desde formas leves hasta enfermedad grave con insuficiencia respiratoria y fracaso multiorgánico. Los pacientes con mayor predisposición a la enfermedad son los tratados con inmunosupresores o que han recibido trasplante de órgano sólido, aunque la mayoría de casos ocurren en individuos de edad avanzada, fumadores o con broncopatía crónica. El período de incubación es de 2 a 10 días; en general, suele ser de 5 a 6 días (10).

La presentación clínica se manifiesta como una neumonía con fiebre, gran ataque del estado general, cefalea, estado toxémico, escalofríos, tos, y síndrome de condensación pulmonar. Además del daño pulmonar pueden verse comprometidos el aparato digestivo, el hígado, el riñón y el SNC. La mortalidad es muy alta si el paciente no es diagnosticado y no recibe tratamiento (55).

4.2.Fiebre de Pontiac.

Es un proceso epidémico de carácter leve parecido a una gripe, con fiebre, artromialgias y afectación general. Presenta además cefalea, escalofríos, rinorrea y tos (55). Tiene un curso autolimitado: los enfermos se recuperan espontáneamente sin tratamiento en 2-5 días, por lo que se asemeja mucho a un cuadro viral. Afecta a personas jóvenes sanas. No tiene focalidad, es de corta duración y no tiene afectación pulmonar (56). Su incidencia conocida es muy baja, siendo mucho menos frecuente que la enfermedad del legionario. Los brotes se han descrito en trabajadores de oficinas e industrias y en usuarios de baños y jacuzzi. Posiblemente existen formas esporádicas, aunque la falta de una prueba diagnóstica específica dificulta su reconocimiento. El período de incubación es de 5 a 66 horas; en general, de 24 a 48 horas (10).

Se han producido brotes de legionelosis en los que algunos pacientes desarrollan la enfermedad del legionario y otros la fiebre de Pontiac (2).

La presentación esporádica es rara; se desconoce si esto es una realidad u obedece a que es una enfermedad infradiagnosticada (56).

Se han descrito brotes de fiebre de Pontiac tras la exposición a torres de refrigeración, aire acondicionado, bañeras hidroneumáticas y fuentes decorativas contaminados con bacterias del género *Legionella*. La puerta de entrada es la vía respiratoria, a través de aerosoles contaminados (56). La tabla N° 5 nos muestra la comparación entre las principales enfermedades causadas por la bacteria.

Tabla N°5: Cuadro comparativo entre las dos entidades clínicas que genera *Legionella spp.*
Fuente: Elaboración propia. Escobar, C. (2021)

	Enfermedad de los legionarios	Fiebre de Pontiac
Cuadro clínico	Cuadro de neumonía aguda y grave. Enf. multisistémica	Cuadro no neumónico semejante a gripe, Enf. tipo catarral
Tasa de letalidad	Variable dependiendo de la susceptibilidad (15-30%); en pacientes hospitalarios puede alcanzar el 40-80%	Nula (<1%)
Sintomas y signos	<ul style="list-style-type: none"> - A menudo inespecíficos - Astenia - Tos seca no productiva (≈ 75%) - Fiebre alta (≈70% de los casos) y escalofríos. - Dificultad para respirar (disnea) (≈50%), dolor torácico - Manifestaciones del sistema nervioso central (confusión, delirios) (≈45%) 	<ul style="list-style-type: none"> - Enfermedad parecida a la gripe (de gripe moderada a grave) - Pérdida de fuerza (astenia), cansancio o fatiga - Fiebre (≈85% de los casos) y escalofríos - Dolor de cabeza (≈90% de los casos) - Tos seca (≈45% de los casos)

<p>Recuperación</p> <p>Tratamiento</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Bradicardia relativa (≈40%) - Dolor muscular (mialgias) (≈40%) - Dolor de cabeza (≈30%) - Diarrea (25-50%) - Náuseas, vómitos (10-30%) - Expectoraciones con trazas de sangra (hemoptisis) (≈20%) - Fallo renal - Hiponatremia (sodio sérico < 131 mmol/L) - Niveles de lactato deshidrogenasa > 700 unidades/ml - Fallo de respuesta a antibióticos betalactámicos o aminoglucósidos <p>Recuperacion lenta (semanas)</p> <p>Tratamiento de elección: Macrólifos: Eritromicina</p> <p>Se puede recurrir a quinolonas y como última instancia tetraciclinas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Dolor muscular (mialgias) (≈95% de los casos) - Dolor articular (artralgia) - Diarrea (≈20% de los casos) - Náuseas, vómitos (≈10% de los casos) - Dificultad respiratorio (disnea) - Manifestaciones del sistema nervioso central, tales como confusión (≈20% de los casos) <p>Recuperación de 2 a 5 días</p> <p>Sólo requiere tratamiento sintomático</p>
--	--	--

La enfermedad de los legionarios es una enfermedad grave considerando que los pacientes presentan alguna condición base. Se indica que la mortalidad de la enfermedad incluso con tratamiento antimicrobiano llega a un 15%, y que sin el tratamiento es mayor (13). Presenta en forma inicial una sintomatología inespecífica, lo cual dificulta diagnóstico, y aunque

ningún patrón de radiografía de tórax puede separar esta infección de otros tipos de neumonía, los infiltrados alveolares son más comunes en la enfermedad del legionario (2).

La mayoría de los pacientes experimentarán disnea. La alteración del estado mental suele ser prominente; el 60% de los pacientes experimentará una depresión en su nivel de conciencia que va desde letargo hasta embotamiento. Sin embargo, la infección por *Legionella* no se presenta con un síndrome clínico distintivo; no se puede diferenciar de forma fiable de la neumonía debida a otros patógenos bacterianos sobre la base de los signos y síntomas (57). La tabla N° 6 presenta los signos, síntomas y valores de laboratorio expresados en porcentaje.

La neumonía debida a especies de *Legionella no pneumophila* se asemeja a la debida a *L. pneumophila* clínica y radiográficamente. Más del 90% de los pacientes experimentan fiebre y la temperatura máxima supera los 39,4 ° C (103 ° F) en aproximadamente el 50% de los pacientes. Aunque la mayoría de los pacientes producen algo de esputo, su producción suele ser escasa (15).

Tabla N°6: Manifestaciones clínicas, de laboratorio y radiológicas de la neumonía por *Legionella*. Fuente: Elaboración propia. Escobar, C. (2021)

Tos	70-80%
Expectoración	40%-50%
Disnea	40%-60%
Dolor torácico	30%-40%
Hemoptisis	30%-50%
Cefaleas	20%-35%
Confusión	20%-35%
Náuseas y vómitos	20%-35%
Diarrea	25%-30%
Dolor abdominal	5%-10%
Leucocitosis y neutrofilia	50%-75%
GOT y/o GPT elevadas	30%-50%
CK elevada	10%-15%

Hiponatremia	15%-55%
Infiltrado único y unilateral	70%-80%
Infiltrados múltiples	20%-30%
Infiltrados bilaterales	15%-25%
Derrame pleural	15%-25%
Cavitación	4%-8%

*CK: creatinquinasa

Se presenta en forma de casos esporádicos y de brotes epidémicos. Es habitual diferenciar el entorno comunitario del hospitalario en que se presentan estas dos formas. En la comunidad, gran parte de los casos son esporádicos sin relación con brotes conocidos. Algunos brotes son de aparición puntual o explosiva, mientras que otros tienen una evolución de meses o años (10). Las principales características de la legionelosis, incluyendo la diseminación a otros órganos se muestran en la tabla N° 7.

Con relación a las manifestaciones extrapulmonares, se han descrito algunas formas extrapulmonares sin afectar simultáneamente a los pulmones. Entre ellas destaca: sinusitis, pericarditis, pielonefritis, pancreatitis, endocarditis e infección de heridas quirúrgicas. Se cree que la puerta de entrada para estas infecciones sigue siendo respiratoria y que el método de difusión a otros órganos sea por vía hematógena, aunque la infección de heridas quirúrgicas se relaciona con agua contaminada donde la inoculación de la cepa es directa (26).

Tabla N°7: Principales características de la legionelosis. *Fuente:* Elaboración propia. Escobar, C. (2021)

Manifestación	Neumonía	Ocurrencia	Velocidad	Periodo de incubacion	Especies relacionadas
Enf. Del legionario	Casi siempre	Epidémico, esporádico, nasocomial,	Lento	Largo (días)	Todas, especialmente

		comunitario.			<i>L. pneumophila,</i> <i>y L. micdadei</i>
Fiebre de Pontiac	Nunca	Epidémico y comunitario	Rápido	Corto (horas)	<i>L. pneumophila,</i> <i>L. micdadei, L. leeleyi</i>
Diseminación	Rara vez	Raro, esporádico, nasocomial.	Raro		<i>L. pneumophila,</i> <i>L. dumollii</i>

Aunque hay notificaciones de la enfermedad durante todo el año, la mayor parte de los casos esporádicos y brotes comunitarios se produce a finales del verano y el otoño, debido presumiblemente a que el microorganismo prolifera mejor en los reservorios acuáticos durante los meses de calor. En los hospitales, los casos y brotes, que fundamentalmente se asocian a los circuitos de distribución de agua sanitaria caliente, se pueden producir durante todo el año (10).

5. DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Es necesario hacer la diferencia entre el diagnóstico de la fiebre de Pontiac, y la legionelosis, dos cuadros clínicos diferentes. La sospecha diagnóstica de la fiebre de Pontiac debe surgir ante cuadros febriles autolimitados de presentación epidémica. El diagnóstico es siempre retrospectivo y por tanto su utilidad queda restringida para estudios epidemiológicos, careciendo de valor para el clínico que trata al paciente en la fase aguda. Se basa en la presencia de un cuadro clínico compatible y en la demostración de seroconversión o aumento de 4 veces del título de anticuerpos en el suero de convalecencia respecto al de fase aguda tomadas con 4 a 8 semanas de diferencia (58). Un título único igual o mayor de 1/256 se considera un diagnóstico de presunción de infección reciente. La existencia de varios serotipos de *Legionella* sin que exista reacción cruzada entre ellos y el hecho de que en la práctica asistencial, habitualmente, sólo se determinen los anticuerpos frente a *Legionella pneumophila* serogrupo 1, condiciona que algunos casos pasen desapercibidos (59). El microorganismo causal no se ha aislado nunca en los propios pacientes. Esto puede deberse a que dada la naturaleza benigna del cuadro es difícil justificar los procedimientos invasivos necesarios para obtener muestras apropiadas para cultivo en ausencia de tos productiva. También se ha sugerido que la fiebre de Pontiac podría estar causada por legionelas no viables y que la patogenia dependería de hipersensibilidad a antígenos bacterianos más que a una verdadera infección.

El conocimiento del agente responsable del brote epidémico surge del aislamiento del microorganismo a partir de la fuente de contagio. Se han descrito brotes causados por diversos serogrupos de *L. pneumophila*, *L. micdadei*, *L. feelei* y *L. anisa*. La determinación del antígeno de *Legionella spp.* en orina, podría ser útil para hacer un diagnóstico en la fase aguda de la enfermedad, aunque este sólo está disponible para el serogrupo 1 de *L. pneumophila* (56).

Se desconoce porqué la infección por las especies del género *Legionella* produce en unos casos neumonía y en otros fiebre de Pontiac. Se han implicado diversos factores como el diferente tamaño del inóculo, diferentes modos de transmisión, el estado inmunitario del

huésped y la virulencia de la cepa. Se ha demostrado que en un mismo brote epidémico pueden presentarse simultáneamente ambas formas clínicas de la enfermedad (56).

Por otro lado, la neumonía grave por la bacteria plantea un desafío diagnóstico y requiere una intervención temprana, lo que se relaciona en parte con la falta de herramientas de diagnóstico fácilmente accesibles para ayudar a la identificación temprana de la infección por legionelosis (60). Se realizan varios exámenes para el diagnóstico de neumonía por *Legionella spp.* para obtener el diagnóstico más preciso, que incluyen; pruebas de antígeno urinario, cultivos de muestras respiratorias, pruebas de detección de ácido nucleico y pruebas de anticuerpos séricos. Aunque el cultivo de la especie *Legionella* a partir de una muestra respiratoria es el estándar de oro de diagnóstico (61).

En ocasiones los resultados de laboratorio no distinguen la neumonía por este microorganismo de la debida a otras bacterias. La mayoría de los pacientes presentará leucocitosis con predominio de leucocitos polimorfonucleares; en pacientes que reciben agentes inmunosupresores o quimioterapéuticos citotóxicos, la leucocitosis puede no desarrollarse. Son frecuentes las elevaciones leves de los niveles de transaminasas y fosfatasa alcalina. La hiponatremia se produce en aproximadamente un tercio de los pacientes (15).

En relación al aislamiento de la bacteria en cultivo, este es el método de referencia y proporciona un diagnóstico de confirmación de la infección causada por *Legionella spp.* Este método no es muy sensible (10-80%) (62) y tiene como inconveniente el tiempo que tarda en crecer el microorganismo, de 3 a 10-12 días (la mayoría de las colonias de *Legionella spp.* se detectan en 7 días) y que además, muestra muchas diferencias en los resultados obtenidos entre laboratorios (62, 63). Un informe de cultivo negativo, sólo se emite después de 10 días de incubación y revisión periódica (14).

Para el aislamiento se pueden tomar distintas muestras, considerando que se trata de un cuadro de neumonía, aunque generalmente la bacteria se recupera de muestras que sean más invasivas.

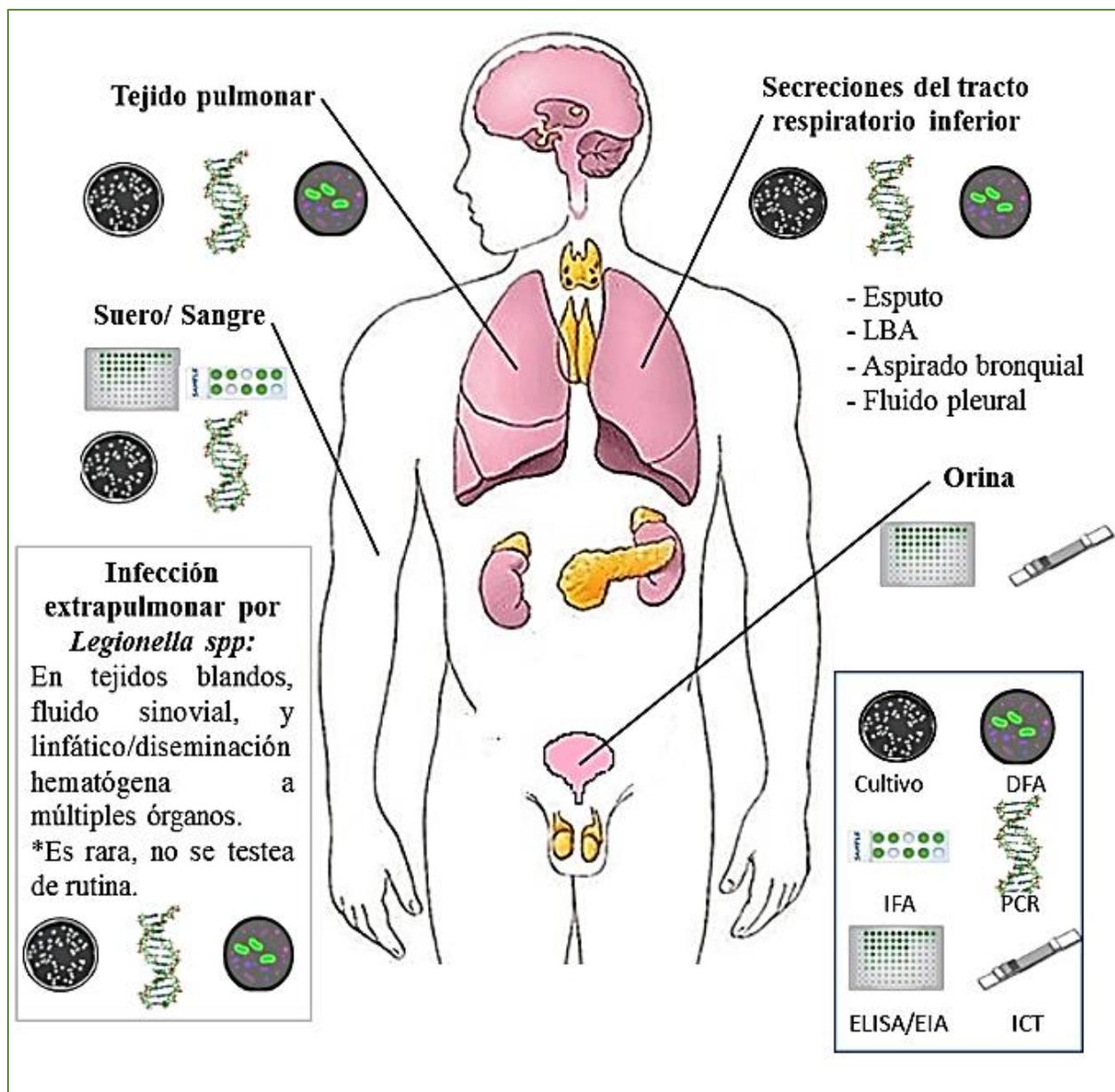
Tabla N°8: Muestras respiratorias y citológicas de donde se puede obtener *Legionella spp.* Fuente: Adaptado de Ausina, V., Catalán V., Cercenado, E., Pelaz, C. (2005)

Secreciones respiratorias contaminadas	Secreciones respiratorias no contaminadas	Tejidos
Espuito expectorado y muestras del tracto respiratorio inferior contaminadas con microbiota del tracto respiratorio superior, como aspirados, lavados o cepillados bronquiales	Muestras del tracto respiratorio inferior no contaminadas, como las obtenidas con cepillo telescópico y por aspiración pulmonar trasparietal.	Tejido pulmonar obtenido por biopsia o necropsia, o tejido de otros órganos. Otras muestras menos frecuentes, como líquido pleural, líquido cefalorraquídeo (LCR) o sangre.

Los lavados broncoalveolares y líquido pleurales son utilizados, aunque se recomienda la centrifugación previa al cultivo, debido a la posible poca cantidad de inóculo bacteriano (26).

Las muestras menos convencionales incluyen las de sitios extrapulmonares, como tejidos blandos, líquidos articulares y sangre (2).

En relación con los medios para aislamiento de las legionelas, se realiza mediante la visualización de crecimiento en extracto de levadura de carbón tamponado (BCYE), en conjunto con la observación de la morfología colonial apropiada y un requerimiento del aminoácido l- cisteína (excepto *L. oakridgensis* y *L. spiritensis*). El medio utilizado para el cultivo de legionelas se ha mejorado varias veces, lo que finalmente ha dado como resultado el medio utilizado actualmente, agar tamponado con extracto de levadura de carbón vegetal (BCYE) enriquecido con α -cetogluturato con y sin agentes selectivos añadidos (2). El medio selectivo para *Legionella* está suplementado con antibióticos, BMPA (BCYE α suplementado con polimixina, cefamandol y anisomicina) (64). Es el único método disponible que permite detectar cualquier especie y serogrupo de *Legionella*. El cultivo permite la realización de



*DFA: test directo de anticuerpos fluorescentes, *IFA: test indirecto de anticuerpos fluorescentes, *ELISA/EIA: enzimoimmunoanálisis de adsorción, *PCR: prueba de reacción en cadena de polimerasa, *ICT: test inmunocromatográficos.

Fig. N° 8: Esquema resumen de las muestras y pruebas utilizadas en el diagnóstico de *Legionella*. Fuente: Elaboración propia. Escobar, C. (2021)

estudios posteriores, como las investigaciones epidemiológicas dirigidas a detectar las fuentes de infección causantes de los casos (13).

Para el primer aislamiento las placas deben incubarse a 35-37°C, en condiciones de aerobiosis y humedad, y aunque el crecimiento de la bacteria generalmente empieza a ser visible a partir del 3er día de incubación, los cultivos se deben mantener en estas condiciones 10- 12 días antes de considerarlos negativos. Pequeñas cantidades de CO₂ (2,5-5%) pueden favorecer el crecimiento de algunas especies (63). Cuando se procesan muestras contaminadas (esputo) se recomiendan tratamientos de descontaminación, ya que ayudan a eliminar la microbiota acompañante y favorecen el reconocimiento de las colonias de *Legionella spp.* Los tratamientos utilizados son de 2 tipos, calor (50°C 30 min) y tratamiento ácido (pH de 2,2 durante 5 min).

Como la mayoría de las cepas de *Legionella* empleadas en el control de los medios de cultivo se adaptan rápidamente a los medios tras sucesivos subcultivos, se recomienda la utilización de un tejido infectado con la bacteria para comprobar el crecimiento (65).

Para el caso de muestras ambientales los métodos empleados son por filtración en membrana a partir de muestra de agua recogida desde los circuitos terminales de duchas, grifos, etc. Y luego se cultivan en los medios selectivos para *Legionella* (26).

En cuanto a las pruebas de identificación, estas se basan en primera instancia en un estudio microscópico (con tinción de Gram para descartar *S. pneumoniae*) y el estudio de anticuerpos mediante inmunofluorescencia directa (11). Esto acompañado de estudios de imagen (radiografía de tórax) y de la anamnesis del paciente con antecedentes de exposición. La anamnesis recoge muchas veces el antecedente de un viaje y/o estancia en un hotel o en un hospital.

Con relación a los test de diagnóstico rápido (TDR) para la legionelosis, el primero en utilizarse fue la inmunofluorescencia directa (IFD) sobre muestras respiratorias utilizando anticuerpos específicos de serogrupo marcados con fluoresceína. La IFD, que puede considerarse una TDR ya que se realiza en aproximadamente una hora, presenta una sensibilidad relativamente baja (60%) por lo que fue desplazada por los test de detección del antígeno de *Legionella* en orina (66, 67). Actualmente el 97% de los diagnósticos clínicos se obtienen mediante una prueba de antígeno en orina. Estas pruebas utilizan anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente la mayoría de los antígenos de lipopolisacáridos del serogrupo 1 de *L. pneumophila*; sin embargo, no detectan la enfermedad

causada por otros serogrupos de *L. pneumophila* u otras especies de *Legionella*. *L. pneumophila* serogrupo 1 causa del 50 al 80% de la enfermedad del legionario; por lo que hasta un 20-50% de los casos de enfermedad del legionario permanecen sin diagnosticar si el antígeno urinario se utiliza como única prueba para el diagnóstico (53). Otros serogrupos de *L. pneumophila* y otras especies también son importantes en la enfermedad, especialmente los serogrupos 4 y 6, y las especies *L. micdadei* y *L. longbeachae*. Aproximadamente el 8% de los pacientes con enfermedad del legionario no excretan antígeno en la orina (68). La sensibilidad y la especificidad oscilan entre el 69 y el 100% y entre el 99 y el 100%, respectivamente (69, 70). El antígeno de *Legionella* en orina puede detectarse desde pocos días desde el inicio de los síntomas hasta meses después de estar resuelta la infección, aunque en la mayoría de los casos se negativiza entre un mes y dos meses desde la aparición de la enfermedad (66). Los resultados de la prueba pueden estar disponibles minutos después del procesamiento. A pesar de sus debilidades, la prueba de antígeno en orina ha revolucionado el diagnóstico de la enfermedad del legionario dada la facilidad de su realización y la rapidez de la prueba.

Últimamente la prueba de antígeno en orina está disponible en varios proveedores en dos formatos principales: un inmunoensayo enzimático (EIA) basado en placa de 96 pocillos, o un ELISA, y una prueba inmunocromatográfica rápida (ICT), en una tarjeta o en tiras, formato, similar a una prueba de embarazo casera (también conocida como prueba de flujo lateral) (58). En los test de detección del antígeno urinario de *Legionella*, la concentración del antígeno mediante filtrado aumenta su sensibilidad. Por otro lado, hervir la orina puede aumentar la especificidad ya que reduce las interacciones no específicas. Sin embargo estas mejoras en las técnicas rápidas incrementan el tiempo y la carga de trabajo hasta la obtención del resultado. Los resultados de los test ICT para la detección del antígeno urinario de *L. pneumophila* serogrupo O1 se obtienen en minutos sin necesidad de personal especializado ni para la toma de muestra ni para su realización. Recientemente ha aparecido un test ICT fluorescente que aporta mayor sensibilidad a la hora de detección, eliminando además el posible sesgo atribuible a la lectura visual del resultado (71).

Concretamente se sugiere no realizar la prueba de orina para detectar el antígeno de *Legionella* en adultos con NAC (recomendación condicional, evidencia de baja calidad), excepto:

1. en los casos en que lo indiquen factores epidemiológicos, como la asociación con un brote de *Legionella* o un viaje reciente (recomendación condicional, evidencia de baja calidad); o
2. en adultos con NAC grave (recomendación condicional, evidencia de baja calidad).

Es recomendable realizar pruebas de antígeno urinario de *Legionella* en conjunto con la recolección de secreciones de las vías respiratorias inferiores para cultivo de *Legionella* en medios selectivos o pruebas de amplificación de ácido nucleico de *Legionella* en adultos con NAC grave (72).

Por otra parte, el ELISA es el método de detección de anticuerpos más utilizado, sobretodo por su utilidad en el diagnóstico precoz de la enfermedad. No obstante, las sensibilidades informadas de los ensayos serológicos varían del 41% al 94% (62). En la mayoría de los casos, se detecta un aumento de cuatro veces en el título de anticuerpos en tres a cuatro semanas. Por lo tanto, las pruebas serológicas para la infección por *Legionella* son una valiosa herramienta epidemiológica, pero tienen poco impacto para el diagnóstico de legionelosis en la etapa temprana de la enfermedad, lo que requiere pruebas adicionales. Las pruebas serológicas de anticuerpos IgG e IgM contra *Legionella* fueron una herramienta de diagnóstico fundamental en la investigación original del brote de Filadelfia (2). La serología sigue siendo relevante para la confirmación de legionelosis cuando el agente infeccioso no se puede aislar, y proporciona datos de apoyo cuando se corrobora con pruebas adicionales como DFA u otros ensayos inmunohistoquímicos. La serología también puede ser valiosa para investigaciones epidemiológicas retrospectivas, para identificar patrones de enfermedad, posibles brotes en curso y seroprevalencia general.

La serología y la inmunofluorescencia tienen papeles históricos, pero tienen un rol limitado en el diagnóstico clínico contemporáneo (54).

Con relación a las pruebas moleculares, en la última década, los avances en la tecnología de reacción en cadena de la polimerasa permitieron el desarrollo de ensayos que detectan ácidos nucleicos de *Legionella* en muestras clínicas y ambientales.

Se han desarrollado protocolos de amplificación isotérmica, PCR convencional y PCR en tiempo real (simple y múltiple) para detección de *Legionella* y caracterización, permitiendo esta última la cuantificación de la diana y el recuento bacteriano. Estos métodos basados en PCR se han aplicado con éxito a la detección e identificación de especies y serogrupos de *Legionella*, en muestras clínicas (esputo, orina, suero) y ambientales. Las técnicas de PCR han proporcionado una mayor sensibilidad y han permitido un proceso de detección más rápido. Sin embargo, se han informado resultados falsos positivos y todavía existe cierta dificultad para distinguir entre resultados verdaderamente falsos positivos o el fracaso del método de referencia (cultivo). La sensibilidad de la prueba varía del 83% al 100%, pero se han informado especificidades inferiores al 99% (62, 73).

La tasa de detección de ADN de *Legionella* en muestras de agua mediante PCR cualitativa suele ser alta, > 90% de las muestras positivas. Sin embargo, la PCR convencional revela solo la presencia o ausencia de los ácidos nucleicos. Además, los resultados pueden verse afectados por los inhibidores de la PCR que están presentes de forma ubicua en las muestras de agua ambiental (74). Por el contrario, la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) da el número de unidades de genoma (GU) por litro, pero todavía se necesita una equivalencia con el número de UFC. Por lo general, el número de GU es mayor que el número de UFC, probablemente relacionado con la presencia de células en estado viable pero no cultivable (VBNC) (75). Pero, la naturaleza de la diana qPCR sigue siendo un tema de debate (76): qPCR detecta ADN de células cultivables, de células VBNC, de células muertas, pero no ADN libre de células muertas.

Hasta la fecha, solo unos pocos estudios han comparado la qPCR y el cultivo para la detección y cuantificación de *L. pneumophila* en muestras de agua natural, agua de hospital o agua de torre de enfriamiento(63):

1. El alto valor predictivo negativo de la PCR (80-100%). Un resultado de PCR negativo es un buen predictor de un resultado de cultivo negativo. Por lo tanto, para *L. Pneumophila*, los resultados de PCR negativos son bastante útiles como indicadores de riesgo (77, 78).
2. La correlación entre cultivo y PCR es aceptable para muestras de agua caliente ($r^2 \sim 0.7$), pero no existe correlación en el caso de muestras de agua de torre de enfriamiento (resultados de cultivo negativos, resultados de PCR positivos altos. Para las muestras de agua

de refrigeración, los resultados de la PCR son valiosos para un seguimiento puntual y permiten sospechar la presencia de VBNC *L. pneumophila* en el caso del tratamiento con biocidas (78)

3. Los resultados de la PCR son más altos que los resultados del cultivo. Este es principalmente el caso de *Legionella spp.* ensayos y para aires acondicionados.

Un resultado de laboratorio positivo de prueba de antígeno en orina de *Legionella*, cultivo bacteriano y/o serología emparejada (es decir, ensayo de anticuerpos fluorescentes indirectos [IFA] o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas [ELISA]) para *Legionella pneumophila* serogrupo 1, define un caso clínico. Además, la detección de antígeno de *Legionella* o bacterias completas en secreciones respiratorias, tejidos o fluidos mediante DFA, detección de seroconversión (aumento de título de 4 veces o más) a serogrupos no serogrupo 1, de especies de *Legionella no pneumophila*, o múltiples especies que utilizan antígenos combinados, y/o la detección del ácido nucleico de *Legionella*, respalda un caso sospechoso o probable en los Estados Unidos (12, 79).

En cuanto a la tinción con anticuerpos inmunofluorescentes monoclonales o policlonales, para demostrar la presencia de *Legionella* en las secreciones respiratorias, se prefiere la tinción con anticuerpos monoclonales a la tinción con anticuerpos policlonales. Con los anticuerpos policlonales, pueden producirse falsos positivos (es decir, reacciones cruzadas con *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bordetella pertussis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacteroides fragilis* y *Bacillus sp*). Las reacciones cruzadas con un anticuerpo monoclonal son poco frecuentes, pero pueden ocurrir con las especies de *S. aureus* o *Bacillus spp.* (12). El ensayo de fluorescencia directa monoclonal (DFA) que tiñe las secreciones respiratorias/pulmón es diagnóstico, pero la positividad de DFA disminuye rápidamente con la terapia anti- *Legionella*. La antigenuria de *Legionella* solo detecta los serogrupos 1 a 6 de *L. pneumophila*. La seroconversión ocurre en menos del 50% de los pacientes dentro de las 2 semanas posteriores al inicio de la enfermedad del legionario (80-82).

Tabla N° 9: Comparación de las principales técnicas diagnósticas. *Fuente:* Elaboración propia Escobar, C. (2021).

Técnica	Cultivo	Serología MIF* (IgG)	Antígeno urinario	DFA** en espectroscopía o LBA	PCR
Sensibilidad (%)	11-80	60-75	55-90	22-75	83-100
Especificidad (%)	100	>90	>95	>90	100
Disponibilidad	-	Variable	Disponible	Variable	Variable
Costo	Elevado	-	Relativamente bajo	Alto	Alto
Otro	Lentitud	Diagnóstico retrospectivo	Solo detecta serogrupo 1	-	-

* microinmuno fluorescencia

**Detección directa de anticuerpos por fluorescencia

Por último, el ensayo de genotipificación de *L. pneumophila* para las investigaciones epidemiológicas mediante la tipificación basada en secuencias (SBT), el estándar de oro actual, desarrollado como una variante de la tipificación de secuencias multilocus (83). La SBT se realiza tradicionalmente en ADN extraído de cultivos aislados; sin embargo, varios estudios han demostrado cierto éxito cuando la SBT estándar o anidada se realizó directamente sobre los ácidos nucleicos extraídos de los tejidos o líquidos del paciente (84, 85).

Aunque sensibles y específicos, los métodos moleculares son costosos y requieren laboratorios especializados y personal bien capacitado. Además, las técnicas moleculares se ven afectadas por su incapacidad para cuantificar el riesgo real para los humanos, ya que no permiten discriminar entre bacterias vivas y muertas, y esto conduce a una falta de correlación entre las unidades genómicas y las cargas bacterianas [expresadas en unidades formadoras de colonias (UFC)]. Por lo tanto, el enfoque basado en cultivo se considera un método de referencia en la vigilancia ambiental de *Legionella* (86), aún así existe la necesidad de apoyar la técnica de cultivo con métodos rápidos y rentables para mejorar el diagnóstico y la adopción del tratamiento antibiótico adecuado.

En años recientes, la espectrometría de masas por ionización-tiempo de vuelo con desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS) ha surgido como una técnica innovadora, rápida y económica para la identificación microbiana a nivel de especie mediante el análisis de patrones de proteínas ribosómicas. Esta técnica ha mejorado la práctica rutinaria de los laboratorios de microbiología clínica, reemplazando la mayoría de las técnicas bioquímicas o moleculares tradicionales (87).

Aunque el uso de EM MALDI-TOF está muy extendido en todo el mundo, se han publicado pocos datos sobre su aplicación para la identificación de *Legionella spp.* en muestras clínicas y ambientales(86, 88-91).

6. SENSIBILIDAD Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Se describió que los antibióticos activos de la pared celular eran ineficaces contra el organismo causante de la enfermedad dado a que la enfermedad del legionario era causada por un patógeno intracelular en macrófagos alveolares. Se descubrió que el organismo responsable de la enfermedad del legionario es susceptible *in vivo* a los macrólidos y tetraciclinas (92, 93). Sin embargo, la tetraciclina fue más eficaz contra *Legionella spp.* que los macrólidos. La tetraciclina para el tratamiento de la enfermedad del legionario ha sido reemplazada gradualmente por doxiciclina. Ha habido informes de fallas de eritromicina en la enfermedad del legionario. Aunque la eritromicina, como otros macrólidos, se concentra a concentraciones suprasueroales en los macrófagos alveolares, los fracasos del tratamiento no son infrecuentes, incluso con eritromicina parenteral (93, 94).

Antes de las quinolonas, la doxiciclina era el pilar de la terapia anti- *Legionella* y sigue siendo muy eficaz contra *Legionella pneumophila*, así como contra otras especies del género que causan la enfermedad del legionario. La rifampicina tiene actividad *in vitro* contra *Legionella spp.* y se ha utilizado en combinación con tetraciclina sin ventajas clínicas demostrables en comparación con la monoterapia con doxiciclina. Cuando se usa doxiciclina para cualquier infección sistémica grave (p. Ej., Enfermedad del legionario), lo ideal es administrarla con un régimen de carga (no una dosis de carga). Debido a que la doxiciclina es altamente soluble en lípidos y tiene una vida media prolongada ($t_{1/2} = 21-24$ horas), se necesitan de 4 a 5 días con dosis IV / PO para alcanzar concentraciones en estado estacionario. Por lo tanto, la terapia con doxiciclina debe instituirse usando una dosis de 200 mg (IV / PO) cada 12 horas durante 72 horas, seguida de 100 mg (IV / PO) cada 12 horas durante el resto de la terapia. El uso de un régimen de carga proporciona concentraciones terapéuticas rápidas de doxiciclina en suero y pulmón. Al igual que las fluoroquinolonas, la doxiciclina tiene una excelente biodisponibilidad y puede administrarse con igual eficacia por vía IV o VO (93, 95).

La tigeciclina es activa contra los patógenos típicos de la neumonía adquirida en comunidad y la enfermedad del legionario. La tigeciclina se concentra bien en el tejido pulmonar y los

macrófagos alveolares y es útil para tratar la enfermedad del legionario en pacientes intolerantes a las fluoroquinolonas (93, 96).

Aunque la rifampicina se concentra en macrófagos alveolares, no debe usarse como monoterapia. La terapia combinada con rifampicina más eritromicina o doxiciclina no es más eficaz que la monoterapia con eritromicina o doxiciclina. Existen pocos estudios sobre la eficacia de la eritromicina más rifampicina para basar cualquier beneficio potencial de la rifampina en comparación con la actividad de la eritromicina o la terapia de combinación de eritromicina / rifampicina (97).

Después de la doxiciclina, el siguiente avance terapéutico más importante en la terapia de la enfermedad del legionario fue la introducción de las fluoroquinolonas. Todas las quinolonas son muy activas *in vitro* e *in vivo* contra todas las especies de *Legionella*. Aunque la doxiciclina es muy activa contra los patógenos típicos de NAC comunes (es decir, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *M. catarrhalis*), las “quinolonas respiratorias” tienen una actividad aún mayor contra estos patógenos, Al igual que la doxiciclina, las quinolonas son eficaces contra los patógenos CAP típicos y atípicos (p. Ej., *Legionella sp*). Las “quinolonas respiratorias”, como los macrólidos y la doxiciclina, penetran bien en los macrófagos alveolares y se concentran intracelularmente a concentraciones suprasueroales. Las “quinolonas respiratorias” proporcionan una monoterapia óptima para la NAC causada por patógenos típicos o atípicos. En pacientes que son intolerantes a las quinolonas, la doxiciclina sigue siendo un agente muy eficaz para todas las especies de *Legionella* que causan la enfermedad del legionario. Las “quinolonas respiratorias” tienen una excelente biodisponibilidad (es decir, más del 90% de absorción) y son ideales para la terapia de cambio de VO o IV a VO para la NAC. Debido a su excelente absorción, incluso en pacientes gravemente enfermos, las “quinolonas respiratorias” se pueden utilizar para tratar la enfermedad del legionario por completo por vía oral (98-101).

Las pruebas de susceptibilidad *in vitro* de *Legionella* deben usarse en un modelo intracelular (por ejemplo, macrófago alveolar) que toma en cuenta el pH y las concentraciones intracelulares de los antimicrobianos que se están probando (92).

De particular interés, un macrólido de próxima generación (el primer fluorocetólido), la solitromicina, se encuentra actualmente en ensayos clínicos de fase III y, al menos in vitro, parece ser muy activo contra Lp1 (102).

La levofloxacinina puede producir una respuesta clínica más rápida que los macrólidos más antiguos, lo que permite una estancia hospitalaria más corta (82).

Un estudio reciente informó de un único aislado clínico que presentaba resistencia a azitromicina y ciprofloxacina fuera del rango de tipo salvaje (103, 104). Un estudio de seguimiento que detalla la base molecular de esta resistencia no pudo determinar si las mutaciones (en el gen *gyrA*) surgieron antes o después de la administración del antibiótico

7. EPIDEMIOLOGÍA

La incidencia de la enfermedad varía entre países, áreas geográficas y estaciones del año, o en función de la vigilancia epidemiológica debido a las diferencias en el seguimiento y la notificación de los casos que, en ocasiones, se deben a deficiencias de los sistemas de vigilancia. A pesar de que la enfermedad tiene presencia mundial, en las zonas industrializadas es más común: en Estados Unidos, Australia y Europa llega a tasas de 10 a 15 casos por cada millón de habitantes por año (105).

Los estudios epidemiológicos indican que *Legionella spp.* es un patógeno oportunista. Posee una distribución mundial, y la enfermedad puede acontecer en forma de brotes y casos aislados o esporádicos (23).

Se han descrito casos de la enfermedad del legionario en África, América del Norte y del Sur, Australia, Europa y Japón por lo que puede decirse que se distribuye por todo el mundo. Ahora bien, los edificios que cuentan con un circuito complejo de suministro de agua y los sistemas de acondicionamiento de aire se hallan más extendidos en los países desarrollados, es en ellos donde la enfermedad presenta una mayor incidencia y constituye un notable problema de salud pública (20).

En Europa, en los últimos años se han producido grandes brotes epidémicos en Países Bajos, Bélgica, y singularmente en España. En Estados Unidos la incidencia de legionelosis es muy variable, siendo más elevada en algunos estados del nordeste (106).

En Estados Unidos, cada año son hospitalizados entre 8000 y 18000 personas debido a la legionelosis, y de ellos el 23% tiene un origen nosocomial (11). Esta puede estar provocada por distintas especies y serogrupos de *Legionella*, aunque el 90 % de los brotes se produce por *Legionella pneumophila serogrupo 1*, causante del brote de 1976 (*Legionella pneumophila* serotipo 1, Philadelphia 1) (107).

En 2014, el brote de *Legionella spp.* en Portugal registro una mortalidad que supera la registrada en los brotes de Japón y Reino Unido. Según el último balance de la Dirección General de la Salud (DGS) de Portugal, 302 personas estaban enfermas con legionelosis y el

número de muertos fue de 9. De igual modo, en España, en Octubre de 2014, según la Agencia de Salud Pública de Cataluña (ASPCAT), en un brote de legionelosis en Sabadell, el número de muertos fue de 10. Y más recientemente (2015), en la ciudad del Nueva York, Estados Unidos, específicamente en El Bronx, una de las zonas más grandes de esa ciudad, se registró un brote que ha dejado 12 víctimas mortales y 128 infectados, según el Departamento de Salud de Nueva York (108).

El estudio de la legionelosis sigue en desarrollo, ya que nuevas especies de *Legionella* han sido descubiertas con el paso del tiempo; sin desestimar que todavía queda mucho por avanzar en lo relativo a la investigación sobre el comportamiento del agente, conocimiento desde la atención primaria de la salud, vigilancia y prevención de la enfermedad

7.1.Epidemiología en Chile

La enfermedad de los legionarios es una causa de neumonía adquirida en la comunidad (NAC) reconocida en todo el mundo. En Latinoamérica su incidencia es desconocida.

La neumonía adquirida en la comunidad (NAC) es un problema frecuente en nuestro país y es una importante causa de morbimortalidad (109).

Encontramos que en Santiago, *L. pneumophila* ocupó el segundo lugar después de *S. pneumoniae* como agente etiológico de NAC grave. La hiponatremia grave al ingreso parece ser un indicador de la etiología de *L. pneumophila* en la NAC grave (110).

En la última década se ha mencionado a la *Legionella spp.* como un importante agente de la NAC que requiere el ingreso a la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), por ello, la mayoría de las normativas, incluida la nacional, recomiendan su cobertura. Si bien se han comunicado casos sospechosos de NAC por *Legionella pneumophila* en Chile, dichos estudios se han basado en evidencia serológica cuya especificidad no supera el 80%. Actualmente existe la posibilidad de comprobar el diagnóstico de NAC por *Legionella pneumophila* serogrupo 1 a través de la determinación de antígeno urinario, cuya especificidad es cercana al 100% (109).

Con relación a la situación actual a nivel país en respuesta a la pandemia por la enfermedad por coronavirus (COVID-19) que se inició el 31 de diciembre de 2019 en la ciudad de Wuhan en China, los gobiernos de los países; entre ellos Chile, donde la confirmación del primer caso de COVID- 19 ocurrió el 3 de marzo de 2020 (111), se impuso cuarentena nacional y con ello el cierre temporal de tiendas y negocios no esenciales, así como la prohibición de eventos recreativos. Si bien estas medidas no farmacéuticas ayudaron a contener la propagación del COVID-19, los edificios desocupados o infrautilizados durante el bloqueo prolongado presentaron un mayor riesgo, al estancar el agua en los dispositivos o sistemas de tuberías, generando condiciones en las que las bacterias dañinas, incluidas *Legionella spp.* puede proliferar, situación que ocurrió en Italia ante un caso asociado a estas características (112)

La aparición de COVID-19 se refleja con síntomas inespecíficos como fiebre, tos y disnea; lo que implica la necesidad de un diagnóstico diferencial preciso de otras causas de neumonía extrahospitalaria, como *Legionella spp.* Además, la neumonía por *Legionella spp.* puede conducir a una serie de hallazgos radiológicos, que incluyen opacidades en vidrio deslustrado o una apariencia de árbol en yema en la TC, que son compatibles con COVID – 19 (113).

Es evidente la importancia de monitorear los sistemas de agua y aire acondicionado al reabrir entornos de trabajo de riesgo, por lo tanto la reapertura debe realizarse teniendo en cuenta la total seguridad tanto de los trabajadores como de los usuarios finales, y los posibles riesgos de crecimiento de *Legionella spp.* deben evaluarse de antemano, con la descontaminación de los sistemas de agua.

8. TRATAMIENTO Y PROFILAXIS

La enfermedad del legionario a menudo progresa en 2 a 3 días a pesar de la terapia antimicrobiana contra *Legionella spp.* Este progreso puede estar relacionado con la ubicación intracelular de *Legionella* en el macrófago alveolar. Si el diagnóstico sindrómico clínico sugiere enfermedad del legionario basándose preferiblemente en un índice de diagnóstico ponderado, los médicos no deben agregar otra terapia antimicrobiana ni considerar diagnósticos alternativos. A medida que el paciente comienza a mejorar, generalmente después de 3 a 5 días, una disminución de la temperatura se acompaña de la desaparición de la bradicardia relativa. La mayoría de las anomalías clínicas y de laboratorio se resuelven rápidamente, pero la fiebre y la confusión mental pueden persistir durante 2 a 3 días. La radiografía de tórax puede mostrar infiltrados durante semanas después de la mejoría clínica (12).

La duración de la terapia para la enfermedad del legionario fue inicialmente de 2 a 4 semanas. La recaída fue común con el tratamiento con eritromicina y, por esta razón, se prolongó la duración del tratamiento para prevenir la recaída. Actualmente, la duración del tratamiento con doxiciclina o quinolonas respiratorias suele ser de 2 semanas. Los huéspedes normales con buena función cardiopulmonar y legionelosis leve a moderada pueden tratarse con ciclos de tratamiento más cortos, pero aquellos con enfermedad grave, alteración de la CMI o función cardiopulmonar gravemente limitada pueden requerir ciclos de tratamiento más largos. Con la terapia adecuadamente dosificada de *Legionella* con doxiciclina o quinolonas respiratorias, las recaídas son raras (93, 101, 114, 115)

Como ya se conoce, *Legionella* es susceptible *in vitro* a diversos antibióticos. Sin embargo la experiencia clínica acumulada con el uso de eritromicina convierte a este antibiótico en el adecuado para el tratamiento de esta enfermedad. Se aconsejan dosis de 500 mg a 1 g cada seis horas durante 14-21 días (116). La rifampicina se ha utilizado asociada a la eritromicina en aquellos casos de evolución más grave. Los nuevos macrólidos, especialmente azitromicina y claritromicina poseen *in vitro* mayor actividad frente a *Legionella* que la eritromicina y probablemente pueden sustituir a esta última cuando se quieren una mejor

tolerancia y comodidad posológica. Por último se tendrá en cuenta el ofloxacino en casos de neumonía grave. Eritromicina ha sido la terapia de elección. Sin embargo, fallas de tratamiento y evidencias experimentales han llevado a evaluar otros antimicrobianos, como azitromicina y quinolonas; levofloxacina y ciprofloxacina han sido utilizadas con éxito (21).

La legionelosis es una enfermedad erradicable. La investigación epidemiológica en busca del origen ambiental de la infección se hace indispensable en situaciones de brotes epidémicos o situaciones endémicas en instituciones. La confrontación de la *Legionella* ambiental y clínica a través de análisis de ADN cromosómico establecerán el nexo definitivo entre foco ambiental y casos clínicos.

Aún cuando lo ideal sería reconstruir el sistema de distribución de aguas en los edificios afectados, casi siempre debemos contentarnos con medidas de hipercalentamiento e hipercloración de las aguas, que consiguen al menos limitar la magnitud del problema. Los efectos secundarios derivados de la utilización de estos últimos aconseja la búsqueda de nuevos métodos de esterilización de las aguas. En este sentido los sistemas de ionización de las mismas han demostrado un gran eficacia y una menor incidencia de efectos adversos

El desarrollo de la enfermedad depende principalmente de la intensidad de la exposición a los aerosoles y la de la susceptibilidad de las personas expuestas. Para reducir o eliminar el riesgo de adquirir la enfermedad o potenciar un brote de la misma, es necesario minimizar las concentraciones de *Legionella spp.* en los sistemas acuáticos y prevenir la transmisión de la bacteria a sujetos susceptibles. La cuestión más importante para prevenirla es el mantenimiento adecuado de los sistemas de agua, además de controlar e investigar los casos de neumonía nosocomial, para poder saber en qué situaciones se produce la transmisión (117, 118).

Legionella spp. puede ser resistente a los tratamientos de agua convencionales como son algunos desinfectantes, biocidas, iones de cobre, etc. Además, la reproducción de esta bacteria en el agua potable depende del mantenimiento del sistema, de si son o no huéspedes de amebas de vida libre, ya que dentro de ellas pueden proliferar y resistir la desinfección térmica y química (118, 119).

La prevención de la formación de biopelículas aparece como una de las estrategias para reducir la contaminación del sistema de agua, aires acondicionados, artefactos e insumos médicos, etc. El tratamiento de los sistemas de agua con biocidas puede hacer que *L. pneumophila* entre en el estado VBNC, lo que hace que la evaluación precisa de los niveles de contaminación con *L. pneumophila* sea engorrosa ya que requiere el co-cultivo de *L. pneumophila* con ameba para levantar el estado de VBNC (120). Los biocidas más comunes que se utilizan para controlar los patógenos transmitidos por el agua son generalmente los derivados del cloro, y los derivados del cloro son más eficaces que los rayos UV para desinfectar *L. pneumophila*.

Recientemente, se ha sugerido que las nanopartículas son herramientas poderosas para prevenir la formación de biopelículas de *L. pneumophila*, ya que las nanopartículas son capaces de interrumpir las interacciones de *L. pneumophila*-amebas y la estructura de la biopelícula (121).

Tabla N° 10: Principales tratamientos para minimizar la supervivencia y multiplicación de *Legionella spp.* Fuente: Elaboración propia Escobar, C. (2021).

<i>Control de la temperatura</i>	Aumento de la temperatura 70°C-80°C asegurando que esta agua circulará en el sistema durante dos o tres días consecutivos, además, garantizar que la temperatura en los puntos más alejados no fuera menor de 60°C
<i>Dióxido de cloro</i>	Desinfectar con este producto es altamente eficiente y no es costoso, aunque no erradica a <i>Legionella spp.</i> completamente del sistema. Es efectivo para controlar el sabor y el color del agua. Su única desventaja es que puede provocar corrosión en tuberías de hierro.

<p><i>Cloración</i></p>	<p>El cloro libre se utiliza principalmente a concentraciones bajas (0,2 mg/L) para el mantenimiento de los sistemas de agua, siempre teniendo una concentración de este continua. Sin embargo, también se puede usar a dosis altas en situaciones de emergencia, cuando existe un brote, que es lo que se conoce como la hipercloración.</p>
<p><i>Cloraminación (monocloroamina) La monocloroamina se forma al agregar amoníaco al agua que contiene cloro l</i></p>	<p>La monocloroamina se forma al agregar amoníaco al agua que contiene cloro libre residual. En comparación con la cloración, este tratamiento es más estable y eficaz. La desventaja de utilizar este tratamiento es que puede provocar el crecimiento de mycobacterias, además, puede atacar a componentes de caucho y plástico.</p>
<p><i>Ionización cobreplata</i></p>	<p>Las cámaras de ionización se han utilizado con éxito para controlar el crecimiento de <i>Legionella spp.</i> Esta ionización no se ve afectada por las altas temperaturas, sin embargo, sí se ve afectada por la presencia de iones cloruro y por la presencia de productos químicos anticorrosivos (fosfatos), además también se ha notificado resistencia por parte de estas bacterias a los iones cobre-plata</p>
<p><i>Radiación de luz ultravioleta (UV)</i></p>	<p>Estos sistemas esterilizan y matan a la bacteria, es bastante eficaz y no tiene efectos adversos en el agua o en el sistema de tuberías. La desventaja es que no es eficaz con la eliminación del biofilm.</p>

Ozonización

La ozonización como tratamiento es más efectivo que los anteriormente nombrados, sin embargo, es muy difícil mantener niveles residuales significativos en todo el sistema, además puede dañar las tuberías.

CONCLUSIONES

- ❖ Las manifestaciones clínicas que tienen como agentes causales a las especies del género *Legionella*, siguen teniendo como agente etiológico principal a *L. Pneumophila* serogrupo 1.
- ❖ Los mecanismos patogénicos y virulentos, que se conforman por un arsenal único, juegan un rol fundamental en la infección de tipo intracelular por *Legionella*. Entre ellos se destaca la capacidad de formar biofilm, el cual a tenido gran relevancia en la transmisión del patógeno desde sitios como; sistemas de aire acondicionado, insumos médicos en centro intrahospitalarios, hoteles, etc.
- ❖ El diagnóstico para confirmar la infección por *Legionella* se realiza con más de una técnica, aunque el estándar de oro sigue siendo el cultivo microbiológico, debido a que permite aislar a más de una especie y serogrupo.
- ❖ La doxiciclina sigue siendo muy eficaz contra *Legionella pneumophila*, así como contra otras especies del género que causan la enfermedad del legionario. Por otro lado, actualmente las quinolonas han tomado bastante relevancia en el tratamiento, ya que son muy activas *in vitro e in vivo* contra todas las especies de *Legionella*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Katz SM, Hammel JM. The effect of drying, heat, and pH on the survival of *Legionella pneumophila*. *Annals of Clinical & Laboratory Science*. 1987;17(3):150-6.
2. Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(3):506-26.
3. Steinert M, Heuner K, Buchrieser C, Albert-Weissenberger C, Glöckner G. *Legionella* pathogenicity: Genome structure, regulatory networks and the host cell response. *International Journal of Medical Microbiology*. 2007;297(7):577-87.
4. Rizzardi K, Winiecka-Krusnell J, Ramliden M, Alm E, Andersson S, Byfors S. *Legionella norrlandica* sp. nov., isolated from the biopurification systems of wood processing plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2015;65(Pt_2):598-603.
5. Khodr A, Kay E, Gomez-Valero L, Ginevra C, Doublet P, Buchrieser C, et al. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Legionella*. *Infection, Genetics and Evolution*. 2016;43:108-22.
6. Graham FF, Hales S, White PS, Baker MG. Review Global seroprevalence of legionellosis - a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*. 2020;10(1):7337.
7. Beauté Julien endlREdVdlEdL. Enfermedad del legionario en Europa, 2011 a 2015.: *Euro Surveill.*; 2017.
8. Harrison TG, Saunders NA. Taxonomy and typing of legionellae. *Reviews in Medical Microbiology*. 1994;5(2):79-90.
9. Benson RF, Fields BS. Classification of the genus *Legionella*. *Semin Respir Infect*. 1998;13(2):90-9.
10. Vaqué Rafart J, Martínez Gómez X. Epidemiología de la legionelosis. *Medicina Integral*. 2002;40(6):271-81.
11. Nath SK, Revankar SG. *Microbiología basada en la resolución de problemas* ©2007: Elsevier; 2007.

12. Cunha BA. Legionnaires' disease: clinical differentiation from typical and other atypical pneumonias. *Infectious disease clinics of North America*. 2010;24(1):73.
13. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiologia Medica*: Elsevier; 2006.
14. Ulloa F MT. *Legionella pneumophila*. *Revista chilena de infectología*. 2008;25:208-.
15. Muder RR, Victor LY. Infection Due to Legionella Species Other Than *L. pneumophila*. *Clinical Infectious Diseases*. 2002;35(8):990-8.
16. Ditommaso S, Giacomuzzi M, Memoli G, Garlasco J, Zotti CM. Comparison of BCYE α +AB agar and MWY agar for detection and enumeration of *Legionella* spp. in hospital water samples. *BMC Microbiology*. 2021;21(1):48.
17. Ausina V, Catalán V, Cercenado E, Antolín CP. *Procedimientos en Microbiología Clínica*
Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. *Diagnóstico microbiológico y control de la legionelosis*: Emilia Cercenado y Rafael Cantón; 2005 p. 7 2.
18. Iso ISO. 11731: 2017 Water Quality—Enumeration of *Legionella*. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland. 2017.
19. Vickers RM, Brown A, Garrity GM. Dye-containing buffered charcoal-yeast extract medium for differentiation of members of the family Legionellaceae. *Journal of Clinical Microbiology*. 1981;13(2):380.
20. Ditommaso S, Giacomuzzi M, Memoli G, Garlasco J, Zotti CM. Sensitivity and Selectivity of Two Commercially Available Media for *Legionella* spp. Recovery from Environmental Water Samples. *Pathogens*. 2020;9(7).
21. Ulloa M. [*Legionella pneumophila*]. *Revista chilena de infectología : órgano oficial de la Sociedad Chilena de Infectología*. 2008;25:208.
22. Garin J, Diez R, Kieffer S, Dermine J-F, Duclos S, Gagnon E, et al. The Phagosome Proteome: Insight into Phagosome Functions. *Journal of Cell Biology*. 2001;152(1):165-80.
23. Steinert M, Hentschel U, Hacker J. *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiology Reviews*. 2002;26(2):149-62.

24. Newton HJ, Ang DKY, van Driel IR, Hartland EL. Molecular Pathogenesis of Infections Caused by *Legionella pneumophila*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2010;23(2):274.
25. Swanson MS, Hammer BK. *Legionella Pneumophila Pathogenesis: A Fateful Journey from Amoebae to Macrophages*. *Annual Review of Microbiology*. 2000;54(1):567-613.
26. Ruiz VA, Guillén SM. *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica: Editorial Médica Panamericana; 2006*.
27. Hägele S, Hacker J, Brand BC. *Legionella pneumophila kills human phagocytes but not protozoan host cells by inducing apoptotic cell death*. *FEMS Microbiology Letters*. 1998;169(1):51-8.
28. Gao L-Y, Abu Kwaik Y. *Activation of Caspase 3 during Legionella pneumophila-Induced Apoptosis*. *Infection and Immunity*. 1999;67(9):4886.
29. Newton HJ, Ang DK, van Driel IR, Hartland EL. *Molecular pathogenesis of infections caused by Legionella pneumophila*. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(2):274-98.
30. Cazalet C, Gomez-Valero L, Rusniok C, Lomma M, Dervins-Ravault D, Newton HJ, et al. *Analysis of the Legionella longbeachae Genome and Transcriptome Uncovers Unique Strategies to Cause Legionnaires' Disease*. *PLOS Genetics*. 2010;6(2):e1000851.
31. Ünal C, Schwedhelm KF, Thiele A, Weiwad M, Schweimer K, Frese F, et al. *Collagen IV-derived peptide binds hydrophobic cavity of Legionella pneumophila Mip and interferes with bacterial epithelial transmigration*. *Cellular Microbiology*. 2011;13(10):1558-72.
32. Appelt S, Heuner K. *The Flagellar Regulon of Legionella-A Review*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2017;7:454-.
33. Jäger J, Marwitz S, Tiefenau J, Rasch J, Shevchuk O, Kugler C, et al. *Human lung tissue explants reveal novel interactions during Legionella pneumophila infections*. *Infect Immun*. 2014;82(1):275-85.
34. Wang C, Saito M, Tanaka T, Amako K, Yoshida S. *Comparative analysis of virulence traits between a Legionella feeleeii strain implicated in Pontiac fever and a strain that caused Legionnaires' disease*. *Microb Pathog*. 2015;89:79-86.

35. Kirov SM, Castrisios M, Shaw JG. *Aeromonas flagella* (polar and lateral) are enterocyte adhesins that contribute to biofilm formation on surfaces. *Infect Immun*. 2004;72(4):1939-45.
36. Struthers K. *Microbiología clínica: Editorial El Manual Moderno*; 2018.
37. Gómez-Lus ML, Corcuera MT, Gómez-Lus R, Sánchez-Serrano C, Gómez-Aguado F, Alonso MJ, et al. [Structural dynamics of *Legionella pneumophila* and *Legionella bozemanii* colony/biofilm]. *Rev Esp Quimioter*. 2013;26(3):214-9.
38. Abu Khweek A, Fernández Dávila NS, Caution K, Akhter A, Abdulrahman BA, Tazi M, et al. Biofilm-derived *Legionella pneumophila* evades the innate immune response in macrophages. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2013;3:18-.
39. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(9):623-33.
40. Abdel-Nour M, Duncan C, Low DE, Guyard C. Biofilms: the stronghold of *Legionella pneumophila*. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(11):21660-75.
41. Chaabna Z, Forey F, Reyrolle M, Jarraud S, Atlan D, Fontvieille D, et al. Molecular diversity and high virulence of *Legionella pneumophila* strains isolated from biofilms developed within a warm spring of a thermal spa. *BMC Microbiol*. 2013;13:17.
42. Stewart CR, Muthye V, Cianciotto NP. *Legionella pneumophila* persists within biofilms formed by *Klebsiella pneumoniae*, *Flavobacterium* sp., and *Pseudomonas fluorescens* under dynamic flow conditions. *PLoS One*. 2012;7(11):e50560.
43. Bargellini A, Marchesi I, Righi E, Ferrari A, Cencetti S, Borella P, et al. Parameters predictive of *Legionella* contamination in hot water systems: association with trace elements and heterotrophic plate counts. *Water Res*. 2011;45(6):2315-21.
44. Allegra S, Girardot F, Grattard F, Berthelot P, Helbig JH, Pozzetto B, et al. Evaluation of an immunomagnetic separation assay in combination with cultivation to improve *Legionella pneumophila* serogroup 1 recovery from environmental samples. *J Appl Microbiol*. 2011;110(4):952-61.
45. Khaledi A, Bahrami A, Nabizadeh E, Amini Y, Esmaeili D. Prevalence of *Legionella* Species in Water Resources of Iran: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Iranian journal of medical sciences*. 2018;43(6):571-80.

46. Borella P, Bargellini A, Marchegiano P, Vecchi E, Marchesi I. Hospital-acquired Legionella infections: an update on the procedures for controlling environmental contamination. *Ann Ig.* 2016;28(2):98-108.
47. Graham FF, White PS, Harte DJG, Kingham SP. Changing epidemiological trends of legionellosis in New Zealand, 1979–2009. *Epidemiology and Infection.* 2012;140(8):1481-96.
48. Domingo-Pueyo A, Sanz-Valero J, Wanden-Berghe C. Legionelosis ocupacional en mayores de 18 años: revisión sistemática. *Ciência & Saúde Coletiva.* 2019;24:793-804.
49. Boamah DK, Zhou G, Ensminger AW, O'Connor TJ. From Many Hosts, One Accidental Pathogen: The Diverse Protozoan Hosts of Legionella. *Frontiers in cellular and infection microbiology.* 2017;7:477-.
50. Correia AM, Ferreira JS, Borges V, Nunes A, Gomes B, Capucho R, et al. Probable Person-to-Person Transmission of Legionnaires' Disease. *New England Journal of Medicine.* 2016;374(5):497-8.
51. Viasus D, Di Yacovo S, Garcia-Vidal C, Verdaguer R, Manresa F, Dorca J, et al. Community-acquired Legionella pneumophila pneumonia: a single-center experience with 214 hospitalized sporadic cases over 15 years. *Medicine.* 2013;92(1).
52. Cunha BA. Severe Legionella pneumonia: rapid presumptive clinical diagnosis with Winthrop-University Hospital's weighted point score system (modified). *Heart & Lung.* 2008;37(4):311-20.
53. Stout JE, Goetz AM, Yu VL. Hospital epidemiology and infection control. Lippincott Williams, & Wilkins. 2011.
54. Bradley BT, Bryan A. Emerging respiratory infections: The infectious disease pathology of SARS, MERS, pandemic influenza, and Legionella. *Seminars in Diagnostic Pathology.* 2019;36(3):152-9.
55. Cabello RR. Microbiología y parasitología humana / Microbiology and Human Parasitology: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias / Etiological Basis of Infectious and Parasitic Diseases: Editorial Medica Panamericana Sa de; 2007.
56. Espinosa Parra FJ, Alemán Lorenzo A, Pretel Serrano L, Moreno Guillén S, Herrero Huerta F. Fiebre de Pontiac esporádica. *Anales de Medicina Interna.* 2001;18:62-3.

57. Mulazimoglu L, Yu VL. Can Legionnaires disease be diagnosed by clinical criteria? A critical review. *Chest*. 120. United States 2001. p. 1049-53.
58. Mercante JW, Winchell JM. Current and Emerging >Legionella Diagnostics for Laboratory and Outbreak Investigations. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015;28(1):95.
59. García-Fulgueiras A, Navarro C, Fenoll D, García J, González-Diego P, Jiménez-Buñuales T, et al. Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain. *Emerging infectious diseases*. 2003;9(8):915-21.
60. Chahin A, Opal SM. Severe Pneumonia Caused by *Legionella pneumophila*: Differential Diagnosis and Therapeutic Considerations. *Infectious disease clinics of North America*. 2017;31(1):111-21.
61. Ito A, Yamamoto Y, Ishii Y, Okazaki A, Ishiura Y, Kawagishi Y, et al. Evaluation of a novel urinary antigen test kit for diagnosing *Legionella pneumoniae*. *International Journal of Infectious Diseases*. 2021;103:42-7.
62. Den Boer JW, Yzerman EPF. Diagnosis of *Legionella* infection in Legionnaires' disease. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2004;23(12):871-8.
63. Tronel H, Hartemann P. Overview of diagnostic and detection methods for legionellosis and *Legionella* spp. *Letters in Applied Microbiology*. 2009;48(6):653-6.
64. GRANADOS PEREZ R, VILLAVERDE PERIS C. *Microbiología*. Tomo 1: Thomson-Paraninfo; 1997.
65. Valle AG, de las Mercedes Zamudio Durán M. *Manual: microbiología médica : 9o semestre: UNAM, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Carrera Química Farmaceutico Biológica*; 1998.
66. Marimón JM, Navarro-Marí JM. Rapid diagnostic test for respiratory infections. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2017;35(2):108-15.
67. Carratala J, Garcia-Vidal C. An update on *Legionella*. *Current opinion in infectious diseases*. 2010;23(2):152-7.
68. Muñoz MJ, Martínez Toldos MC, Yagüe G, Segovia M. Evaluation of three immunochromatographic assays for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine samples. *Rev Esp Quimioter*. 2009;22(4):207-9.

69. Yzerman EP, den Boer JW, Lettinga KD, Schellekens J, Dankert J, Peeters M. Sensitivity of three urinary antigen tests associated with clinical severity in a large outbreak of Legionnaires' disease in The Netherlands. *J Clin Microbiol.* 2002;40(9):3232-6.
70. Lindsay DSJ, Abraham WH, Findlay W, Christie P, Johnston F, Edwards GFS. Laboratory diagnosis of legionnaires' disease due to *Legionella pneumophila* serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods. *J Med Microbiol.* 2004;53(Pt 3):183-7.
71. Beraud L, Gervasoni K, Freydiere AM, Descours G, Ranc AG, Vandenesch F, et al. Comparison of Sofia Legionella FIA and BinaxNOW® Legionella urinary antigen card in two national reference centers. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2015;34(9):1803-7.
72. Metlay JP, Waterer GW, Long AC, Anzueto A, Brozek J, Crothers K, et al. Diagnosis and Treatment of Adults with Community-acquired Pneumonia. An Official Clinical Practice Guideline of the American Thoracic Society and Infectious Diseases Society of America. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 2019;200(7):e45-e67.
73. Diederens BMW. *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *Journal of infection.* 2008;56(1):1-12.
74. Yanez MA, Barberá VM, Catalán V. Validation of a new seminested PCR-based detection method for *Legionella pneumophila*. *Journal of microbiological methods.* 2007;70(1):214-7.
75. Emtiazi F, Schwartz T Fau - Marten SM, Marten Sm Fau - Krolla-Sidenstein P, Krolla-Sidenstein P Fau - Obst U, Obst U. Investigation of natural biofilms formed during the production of drinking water from surface water embankment filtration. (0043-1354 (Print)).
76. Shih H-Y, Lin YE. Caution on interpretation of *Legionella* results obtained using real-time PCR for environmental water samples. *Applied and environmental microbiology.* 2006;72(10):6859-.
77. Yaradou DF, Hallier-Soulier S, Moreau S, Poty F, Hillion Y, Reyrolle M, et al. Integrated real-time PCR for detection and monitoring of *Legionella pneumophila* in water systems. *Applied and Environmental Microbiology.* 2007;73(5):1452-6.

78. Joly P, Falconnet P-A, André J, Weill N, Reyrolle M, Vandenesch F, et al. Quantitative real-time *Legionella* PCR for environmental water samples: data interpretation. *Applied and environmental microbiology*. 2006;72(4):2801-8.
79. Centers for Disease Control and P. Case definitions: nationally notifiable conditions infectious and non-infectious case. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention. 2012.
80. Helbig JH, Fernandez-Moreira E, Jacobs E, Lück PC, Witt M, Cianciotto NP. *Legionella*: State of the Art 30 Years After its Recognition. 2006.
81. Olsen CW, Elverdal P, Jørgensen CS, Uldum SA. Comparison of the sensitivity of the *Legionella* urinary antigen EIA kits from Binax and Biotest with urine from patients with infections caused by less common serogroups and subgroups of *Legionella*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009;28(7):817-20.
82. Mykietiuk A, Carratalà J, Fernández-Sabé N, Dorca J, Verdager R, Manresa F, et al. Clinical outcomes for hospitalized patients with *Legionella* pneumonia in the antigenuria era: the influence of levofloxacin therapy. *Clin Infect Dis*. 2005;40(6):794-9.
83. Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Lück PC. Addition of neuA, the gene encoding N-acylneuraminate cytidyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007;45(6):1965-8.
84. Scaturro M, Fontana S, Ricci ML. Use of nested polymerase chain reaction based on sequence-based typing of clinical samples to determine the source of infection for hospital-acquired Legionnaires' disease. *infection control and hospital epidemiology*. 2011;32(5):510-2.
85. Coscollá M, González-Candelas F. Direct sequencing of *Legionella pneumophila* from respiratory samples for sequence-based typing analysis. *Journal of clinical microbiology*. 2009;47(9):2901-5.
86. Pascale MR, Mazzotta M, Salaris S, Girolamini L, Grottola A, Simone ML, et al. Evaluation of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Diagnostic and Environmental Surveillance of *Legionella* Species: A Comparison With Culture and Mip-Gene Sequencing Technique. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11:3172.

87. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in microbiology*. 2015;6:791.
88. Fujinami Y, Kikkawa HS, Kurosaki Y, Sakurada K, Yoshino M, Yasuda J. Rapid discrimination of *Legionella* by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Microbiological research*. 2011;166(2):77-86.
89. Gaia V, Casati S, Tonolla M. Rapid identification of *Legionella* spp. by MALDI-TOF MS based protein mass fingerprinting. *Systematic and applied microbiology*. 2011;34(1):40-4.
90. Svarrer CW, Uldum SA. The occurrence of *Legionella* species other than *Legionella pneumophila* in clinical and environmental samples in Denmark identified by mip gene sequencing and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical microbiology and infection*. 2012;18(10):1004-9.
91. Trnková K, Kotrbancová M, Špaleková M, Fulová M, Boledovičová J, Vesteg M. MALDI-TOF MS analysis as a useful tool for an identification of *Legionella pneumophila*, a facultatively pathogenic bacterium interacting with free-living amoebae: A case study from water supply system of hospitals in Bratislava (Slovakia). *Experimental parasitology*. 2018;184:97-102.
92. Edelstein PH, Christian L. *Legionella*. *Manual of Clinical Microbiology*. American Society of Microbiology; 2015.
93. Cunha BA. *Pneumonia Essentials 2010*: Jones & Bartlett Publishers; 2010.
94. Sabrià M, Pedro-Botet ML, Gómez J, Roig J, Vilaseca B, Sopena N, et al. Fluoroquinolones vs macrolides in the treatment of Legionnaires disease. *Chest*. 2005;128(3):1401-5.
95. Cunha BA. Doxycycline for community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis*. 37. United States 2003. p. 870.
96. Dartois N, Castaing N, Gandjini H, Cooper A. Tigecycline versus levofloxacin for the treatment of community-acquired pneumonia: European experience. *J Chemother*. 2008;20 Suppl 1:28-35.
97. Amsden GW. Treatment of Legionnaires' disease. *Drugs*. 2005;65(5):605-14.

98. Cunha BA. Severe adenovirus community-acquired pneumonia mimicking Legionella. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009;28(3):313-5.
99. Cunha BA. Fluoroquinolones in the treatment of Legionnaires' disease. *Penetration*. 2000;3:32-9.
100. Ludlam HA, Enoch DA. Doxycycline or moxifloxacin for the management of community-acquired pneumonia in the UK? *Int J Antimicrob Agents*. 2008;32(2):101-5.
101. Cunha BA. Empiric therapy of community-acquired pneumonia: guidelines for the perplexed? *Chest*. 2004;125(5):1913-9.
102. Mallegol J, Fernandes P, Melano RG, Guyard C. Antimicrobial activity of solithromycin against clinical isolates of Legionella pneumophila serogroup 1. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(2):909-15.
103. Bruin JP, Koshkolda T, Ijzerman EPF, Lück C, Diederens BMW, Den Boer JW, et al. Isolation of ciprofloxacin-resistant Legionella pneumophila in a patient with severe pneumonia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014;69(10):2869-71.
104. Bébéar C, Pereyre S, Peuchant O. Mycoplasma pneumoniae: susceptibility and resistance to antibiotics. *Future microbiology*. 2011;6(4):423-31.
105. Gea-Izquierdo E. Legionelosis en España, 2010-2015. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*. 2021;41(1):168-78.
106. Marston BJ, Lipman Hb Fau - Breiman RF, Breiman RF. Surveillance for Legionnaires' disease. Risk factors for morbidity and mortality. (0003-9926 (Print)).
107. Gea-Izquierdo E. Legionelosis. *Revista Cubana de Medicina General Integral*. 2014;30:509-14.
108. Sandra-Toledo L, Paz-Montes A, Fuenmayor-Boscán A, Piña-Reyes E, Ávila-Roo Y, Nava-Díaz M. Legionella spp. como agente etiológico de neumonía. *Kamera*. 2015;43:130-8.
109. Cabello A H, Cortés M C, Ruiz C M, Jover L E, Rivera Ch F, Segovia R E, et al. Neumonía adquirida en la comunidad: Comunicación de 8 casos de neumonía grave por Legionella pneumophila serogrupo 1 en Chile. *Revista médica de Chile*. 2002;130:309-13.
110. Arancibia F, Cortes CP, Valdés M, Cerda J, Hernández A, Soto L, et al. Importance of Legionella pneumophila in the Etiology of Severe Community-Acquired Pneumonia in Santiago, Chile. *Chest*. 2014;145(2):290-6.

111. Arteaga Herrera Ó. COVID-19. *Revista médica de Chile*. 2020;148:279-80.
112. Palazzolo C, Maffongelli G, D'Abramo A, Lepore L, Mariano A, Vulcano A, et al. Legionella pneumonia: increased risk after COVID-19 lockdown? Italy, May to June 2020. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2020;25(30):2001372.
113. Kim KW, Goo JM, Lee HJ, Lee HY, Park CM, Lee CH, et al. Chest Computed Tomographic Findings and Clinical Features of Legionella Pneumonia. *Journal of Computer Assisted Tomography*. 2007;31(6).
114. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis*. 2007;44 Suppl 2(Suppl 2):S27-72.
115. Pedro-Botet ML, Yu VL. Treatment strategies for Legionella infection. *Expert Opin Pharmacother*. 2009;10(7):1109-21.
116. Pedro-Botet ML, Sabria-Leal M Fau - Haro M, Haro M Fau - Rubio C, Rubio C Fau - Gimenez G, Gimenez G Fau - Sopena N, Sopena N Fau - Tor J, et al. Nosocomial and community-acquired Legionella pneumonia: clinical comparative analysis. (0903-1936 (Print)).
117. Springston JP, Yocavitch L. Existence and control of Legionella bacteria in building water systems: A review. (1545-9632 (Electronic)).
118. Cristino S, Legnani PP, Leoni E. Plan for the control of Legionella infections in long-term care facilities: role of environmental monitoring. *Int J Hyg Environ Health*. 2012;215(3):279-85.
119. Mouchtouri VA, Rudge JW. Legionnaires' Disease in Hotels and Passenger Ships: A Systematic Review of Evidence, Sources, and Contributing Factors. *J Travel Med*. 2015;22(5):325-37.
120. Alleron L, Merlet N, Lacombe C, Frère J. Long-term survival of Legionella pneumophila in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment. *Curr Microbiol*. 2008;57(5):497-502.
121. Raftery TD, Lindler H, McNealy TL. Altered host cell-bacteria interaction due to nanoparticle interaction with a bacterial biofilm. *Microb Ecol*. 2013;65(2):496-503.