1

INTRODUCCIÓN 1

Descripción del microorganismo 3
- Clasificación 3
- Características morfológicas y fisiológicas 5

Epidemiología 8

Patogenicidad 10

Significado clínico 11

Diagnóstico microbiológico 13
- Cultivo 14
- Inmunofluorescencia directa 15
- Serología 16
- Antígeno urinario 17

Diagnóstico basado en la detección de ADN 18
- Detección de ADN por PCR ordinaria 18
- Detección de ADN por PCR en tiempo real 19

OBJETIVOS 22

2

MATERIAL Y MÉTODOS 24

Pacientes y muestras 25

Diagnóstico convencional 25
- Cultivo 25
- IFD 26

Amplificación de ADN en muestras respiratorias 26
- Detección de ADN de *Legionella* mediante PCR ordinaria: *Legionella DNA presence SBF39* (*Symbiosis*®) 26
- Detección de ADN de Legionella mediante PCR en tiempo real: *ProbeTec*® (*Becton Dickinson*®) 32

Amplificación de ADN en muestras de orina 34

Estudio estadístico 35

Tampones y soluciones 36

3

RESULTADOS 37

Muestras respiratorias 38
- Resultados de PCR ordinaria 41
- Resultados de PCR en tiempo real 47

Muestras de orina 48

4

DISCUSIÓN 50

5

CONCLUSIONES 56

6

BIBLIOGRAFÍA 59

1

INTRODUCCIÓN

En el verano de 1976, se produjo en Filadelfia un brote de neumonía atípica que afectó a los asistentes a una convención de la Legión Americana organizada en un hotel de la ciudad, el Bellevue-Stratford (Fraser, 1977). Como consecuencia, 34 de las 221 personas afectadas murieron y la neumonía pasó a llamarse enfermedad del legionario.

Este suceso supuso el inicio de una intensa investigación que llevó a la descripción de una nueva clase de bacterias, la familia *Legionellaceae* (Winn, 1988). Estas bacterias pertenecen al grupo de los denominados microorganismos fastidiosos, lo que explica las dificultades encontradas para el aislamiento del organismo responsable del brote. Una vez que se identificó, se comprobó que era una bacteria desconocida hasta entonces y recibió el nombre de *Legionella pneumophila*, en honor a los pacientes afectados y al trofismo de este microorganismo por el pulmón (Sabrià, 2002).

1. DESCRIPCIÓN DEL MICROORGANISMO

1.1 Clasificación

Aunque el estudio de la legionelosis, nombre con el que se conoce la patología causada por las bacterias del género *Legionella*, se inició en el año 1976, este género no fue establecido hasta tres años más tarde. En 1979, los estudios de hibridación ADN-ADN realizados por Brenner demostraron que el agente etiológico de la enfermedad del legionario constituía un nuevo género bacteriano, el género *Legionella*, y denominaron *L. pneumophila* a la especie concreta responsable de la enfermedad (Brenner, 1979). El género dio nombre a una nueva familia, *Legionellaceae*, en la que inicialmente se incluyeron tres géneros, *Legionella*, *Fluoribacter* y *Tatlockia*. Sin embargo, análisis posteriores de ácidos nucleicos confirmaron a la familia *Legionellaceae* como un grupo monofilético (**Figura 1**) de la subdivisión *gamma-2* de *Proteobacteria* (Fields, 2002).

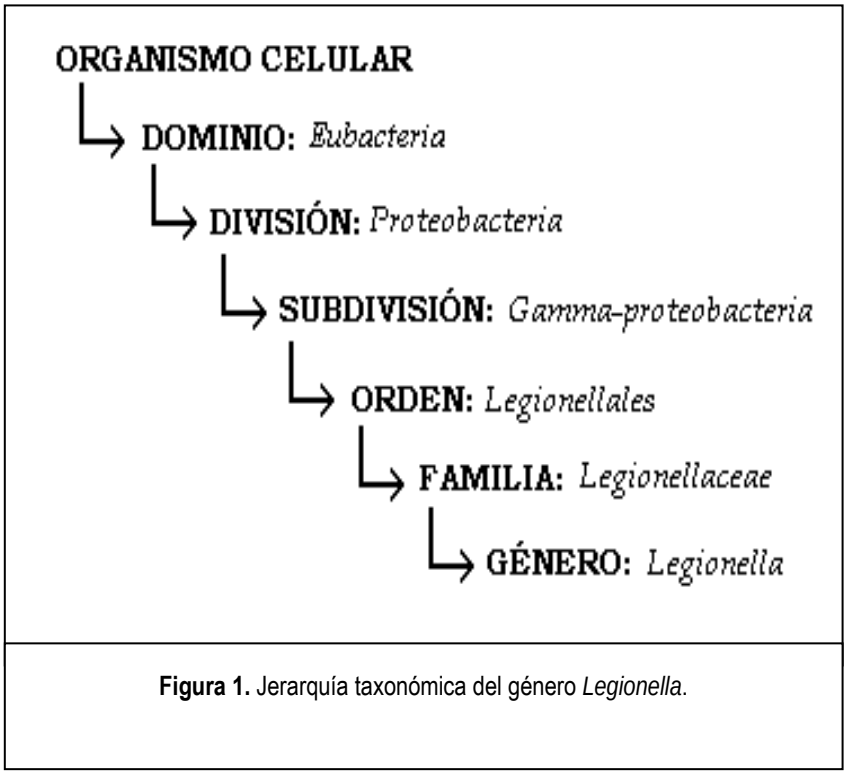


Figura 1. Jerarquía taxonómica del género *Legionella*.

Entre las bacterias conocidas, estudios filogenéticos basados en la secuencia de ARNr 16S (**Figura 2**) sitúan a *Coxiella burnettii*, el agente etiológico de la fiebre Q, como el organismo más cercano a la familia *Legionellaceae*.

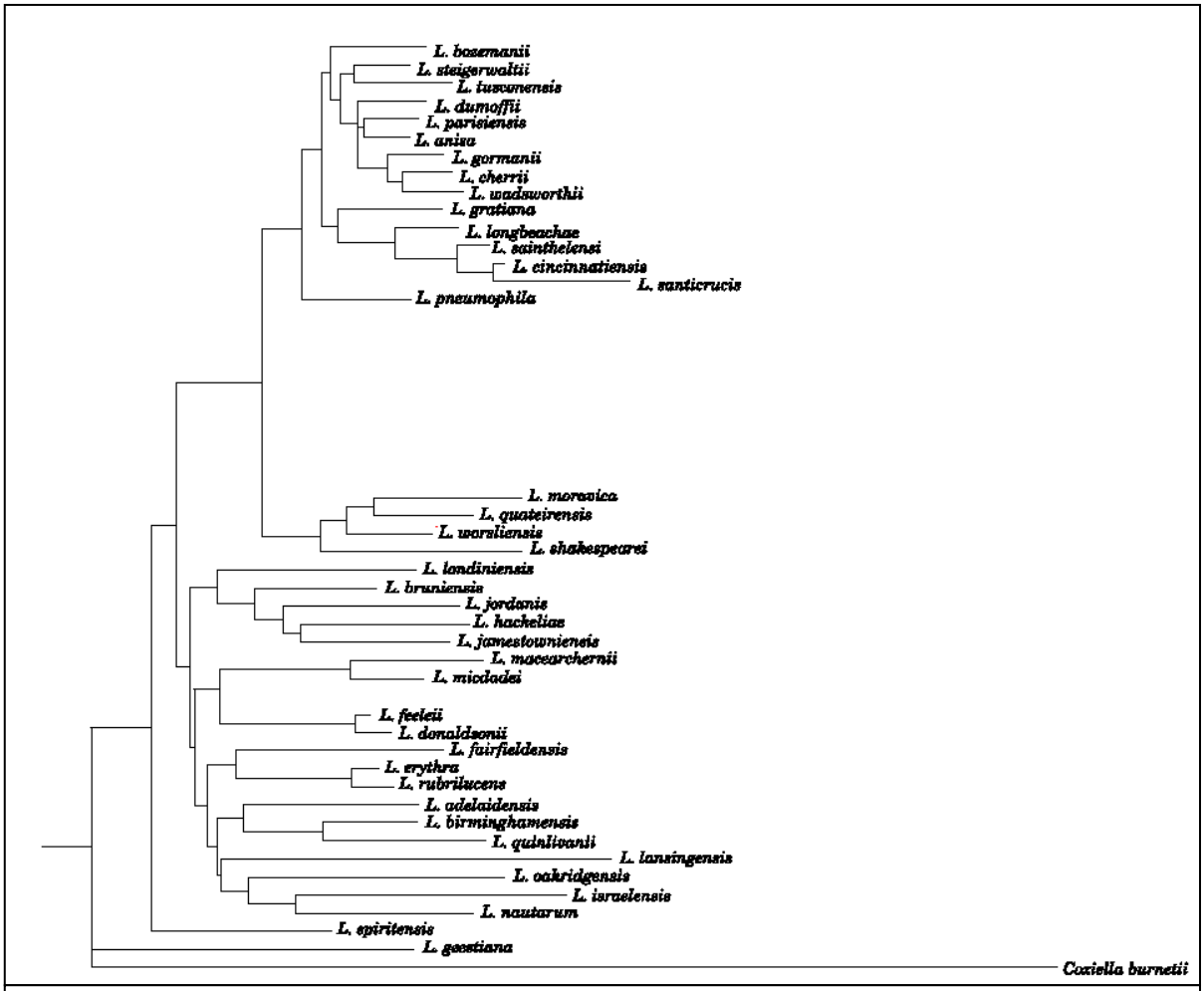


Figura 2. Árbol filogenético del género basado en análisis de ARNr 16S (modificado de Adekele, 1996).

Dentro del género *Legionella* se diferencian 48 especies (**Tabla 1**), de las cuales, hasta el momento, sólo 20 se han identificado como causantes de enfermedad en el hombre. Basándose en criterios serológicos, las distintas especies de *Legionella* se han clasificado en serogrupos. Los serogrupos 1, 4 y 6 son, de los 15 descritos en *L. pneumophila*, los que con mayor frecuencia causan legionelosis.

Especie	Nº de serogrupos	Nº asociado con enfermedades	Especie	Nº de serogrupos	Nº asociado con enfermedades
L. pneumophila	15	15	*L. steigerwaltii*	1	0
L. bozemanii	2	2	*L. rubrilucens*	1	0
L. dumoffii	1	1	*L. israelensis*	1	0
L. miccdadei	1	1	*L. quinlivanii*	2	0
L. longbeachae	2	2	*L. brunensis*	1	0
L. jordanis	1	1	*L. moravica*	1	0
L. wadsworthii	1	1	*L. gratiana*	1	0
L. hackeliae	2	2	*L. adelaidensis*	1	0
L. feeleii	2	2	*L. fairfieldensis*	1	0
L. maceachernii	1	1	*L. shakespearei*	1	0
L. birminhamensis	1	1	*L. waltersii*	1	0
L. cincinnatiensis	1	1	*L.genomospecies*	1	0
L. gormanii	1	1	*L. quateirensis*	1	0
L. sainthelensis	2	2	*L. worsleiensis*	1	0
L. tucsonensis	1	1	*L. geestiana*	1	0
L. anisa	1	1	*L. natarum*	1	0
L. lansingensis	1	1	*L. londoniensis*	1	0
L. erythra	2	1[a]	*L. taurinensis*	1	0
L. parisiensis	1	1	*L. lytica*	1	0
L. oakridgensis	1	1	*L. drozanskii*	1	0
L. spiritensis	1	0	*L. rowbothamii*	1	0
L. jamestowniensis	1	0	*L. fallonii*	1	0
L. santicrucis	1	0	*L. gresilensis*	1	0
L. cherrii	1	0	*L. beliardensis*	1	0

Tabla 1. Especies y serogrupos de *Legionella*.

[a] El serogrupo 2 de *L. erythra* ha sido asociado con enfermedades en humanos (Fields, 2002)

1.2 Características morfológicas y fisiológicas

Las bacterias del género *Legionella* son bacilos gramnegativos, aerobios, no esporulados ni capsulados. Miden de 0.5 a 0.7 μm de diámetro y aproximadamente 2 μm de longitud; su morfología puede ser bacilar o pleomórfica, a veces con formas filamentosas que pueden alcanzar una longitud de hasta 20 μm. A excepción de *L. oakridgensis*, que es inmóvil, las especies restantes son flageladas. Normalmente poseen un solo flagelo polar, pero también se han observado flagelos subpolares y laterales. Por otro lado, se ha visto que algunas cepas procedentes de aislamientos primarios presentan *pili* (Meyer, 1980; Blackmon, 1981; Yu, 1990; Prats, 2002).

En contraste con la mayor parte de las bacterias gramnegativas, en el lipopolisacárido de la pared de *Legionella* se encuentran grandes cantidades de ácidos grasos de cadenas ramificadas, como se demuestra por cromatografía gas-líquido (Lambert, 1989; Jantzen, 1993; Prats, 2002). Estructuralmente se considera una bacteria gramnegativa, pero *Legionella* se visualiza con dificultad mediante la tinción de Gram. En el caso de emplear esta técnica, la fucsina básica da un mejor resultado como colorante de contraste que la safranina. La técnica de Giménez es tan rápida como la tinción de Gram y tiñe el microorganismo de forma más efectiva (Yu, 1990).

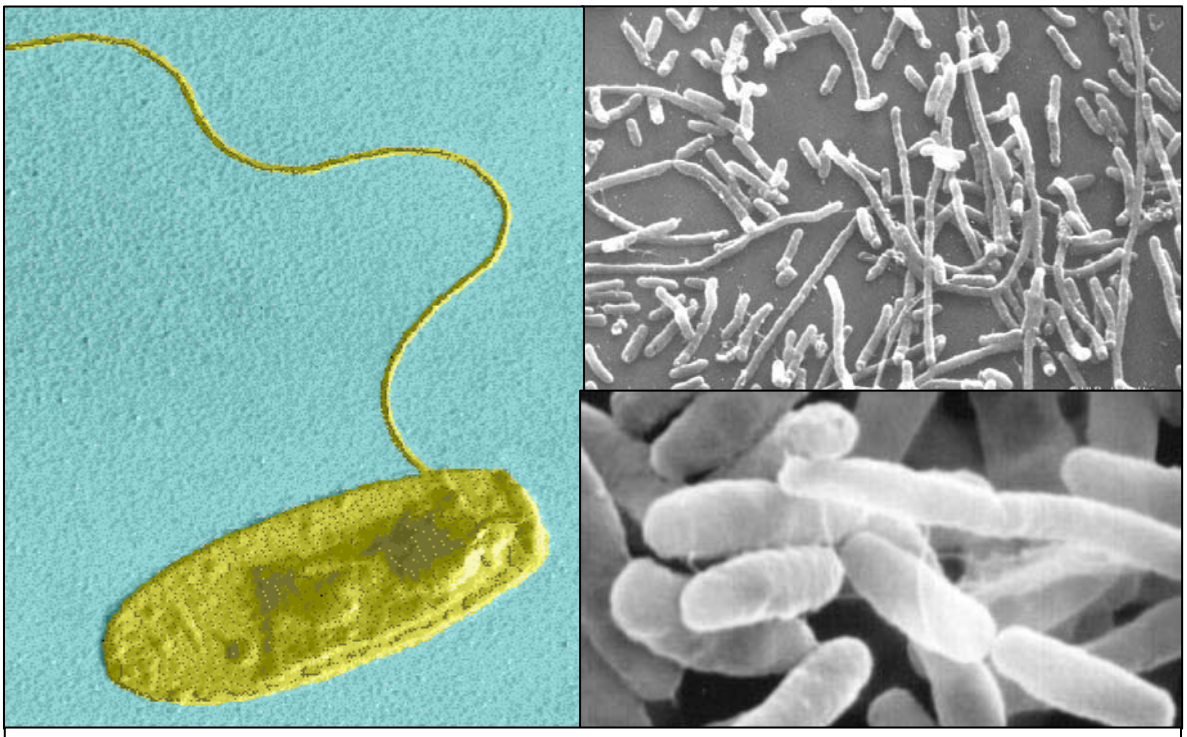


Figura 3. Imágenes de *Legionella* (www.kcl.ac.uk/kis/schools/life_sciences/life_sci/legionella.gif; www.ulb.ac.be/sciences/biodic/images/bacterie/3bactrie.jpg;

En cuanto a su metabolismo, se trata de bacterias aerobias estrictas, capnofílicas (su crecimiento en el laboratorio se ve favorecido con una atmósfera que contenga un 3% de CO_2) y relativamente inactivas. La principal fuente de energía la obtienen por el catabolismo de aminoácidos, pero también pueden oxidar la glucosa a través de la vía de Embden-Meyerhof-Parnas. La producción de oxidasa es variable. Todas las especies contienen superóxido dismutasa así como catalasa y/o peroxidasa, aunque las reacciones suelen ser débiles (Yu, 1990; Prats, 2002).

Un pH cercano a la neutralidad es el más adecuado para el crecimiento de este género bacteriano. *Legionella* es termofílica, crece en el agua a temperaturas entre 20 y 50 ºC y posee un desarrollo óptimo a 35ºC (**Figura 4**). A temperaturas inferiores a 20ºC permanecen latentes, sin

multiplicarse, y sobreviven durante un período de tiempo variable entre 40 y 60ºC. Mueren a temperaturas superiores a 60ºC. La temperatura de crecimiento óptimo y superiores son inusuales en la naturaleza, aunque frecuentes en instalaciones y dispositivos acuáticos artificiales.

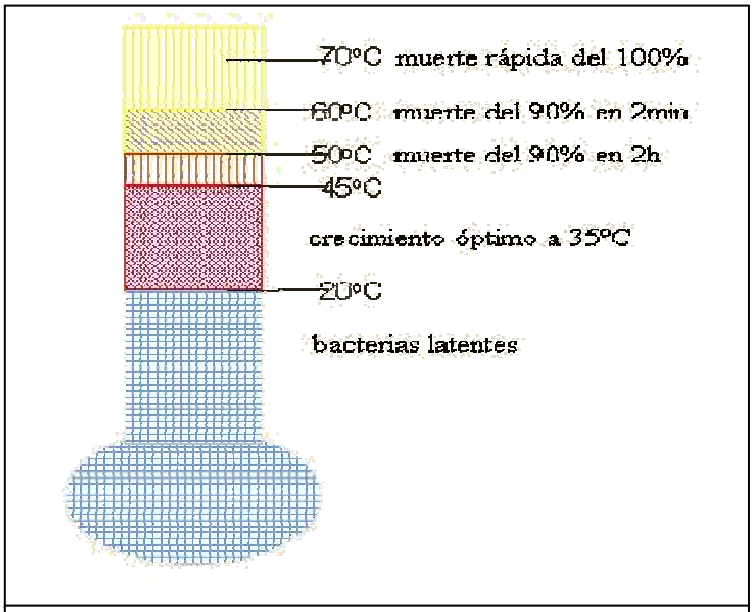


Figura 4. *Legionella* y la temperatura (modificado de www.legionellose.com/images/reseau%20d´eau1.gif).

Son bacterias nutricionalmente muy exigentes, por lo que requieren una combinación única de nutrientes dentro de un orden para crecer en el laboratorio. Debido a esta característica son incapaces de crecer en los medios de cultivo empleados habitualmente en los laboratorios de Microbiología. *Legionella pneumophila* fue aislada por primera vez en agar Muller-Hinton suplementado con hemoglobina e IsoVitaleX. Los componentes esenciales que permitieron un crecimiento en este medio resultaron ser el Fe, contenido en la hemoglobina, y la L-cisteína, aminoácido esencial proporcionado por el IsoVitaleX. Estos refinamientos condujeron al desarrollo del agar Feeley-Gorman, que proporcionó mejores resultados en el crecimiento de la bacteria. Más tarde, el almidón fue sustituido por carbón activado para detoxificar el medio y como fuente de aminoácidos se utilizó extracto de levadura. Actualmente, el medio más utilizado para el cultivo de *Legionella* es Agar BCYE (*buffered charcoal yeast extract*) enriquecido con alfa-cetoglutarato con o sin agentes selectivos añadidos.

Inicialmente, estos requerimientos nutricionales inusuales parecen contradecir la amplia distribución de *Legionella* en ambientes acuáticos. La cantidad de nutrientes que *Legionella* requiere para su crecimiento es raramente encontrada en agua dulce pero, si estuvieran presentes, sólo servirían para amplificar bacterias de crecimiento rápido que podrían competir con *Legionella*. En

realidad, estos nutrientes representan un ambiente intracelular, no nutrientes solubles comúnmente encontrados en agua dulce. Este aspecto es el que relaciona íntimamente a *Legionella* con los protozoos de vida libre como parásito intracelular.

2. EPIDEMIOLOGÍA

En los últimos tres años la epidemiología de la legionelosis se ha visto impactada por la existencia de tres grandes brotes ocurridos en Europa (Vaqué, 2002). En 1999, en Bélgica, más de 300 personas se vieron afectadas tras visitar una feria comercial y, en marzo de ese mismo año, durante una exposición floral en Holanda el número de individuos infectados sobrepasaba los 200. En Julio de 2001, Murcia (España) fue la protagonista del que ha sido el mayor brote de legionelosis informado hasta la fecha, con más de 650 personas afectadas.

La incidencia de neumonías causadas por *Legionella* presenta una gran variación entre los diferentes estudios variando, según distintas series, desde el 1% hasta el 40% (Barlett, 1998). Este rango tan amplio depende del tipo de neumonía estudiado, de las características de los grupos y poblaciones estudiadas, de la temporalidad del estudio y, especialmente, de los criterios y medios diagnósticos empleados.

Formas de presentación

Los casos de aparición esporádica en la comunidad constituyen la forma de presentación más frecuente de la enfermedad, le siguen en orden de frecuencia los que forman parte de brotes comunitarios, y en tercera posición figuran los de origen nosocomial. No obstante, aunque hay evidencias que sugieren que la mayoría de los casos de esta enfermedad ocurren de forma esporádica, éstos son difíciles de identificar (Vaqué, 2002).

Cadena epidemiológica

El reservorio primario de *Legionella* son las aguas superficiales (lagos, ríos…), no habiéndose aislado, hasta el momento, en a partir de agua salada. Este hábitat natural hace que *Legionella* esté considerada como una bacteria ambiental. Entre los aislamientos obtenidos de muestras ambientales se han identificado especies o serogrupos no asociados a enfermedad en el ser humano (ver **Tabla 1**).

Legionella, desde su ambiente acuático natural, se introduce en la vida urbana a través de los sistemas de distribución del agua y coloniza sistemas hídricos e instalaciones construidos por el hombre. Hay que tener en cuenta que aunque la enfermedad del legionario es de distribución mundial, los edificios que cuentan con circuitos complejos de suministro de agua y con sistemas de acondicionamiento de aire se hallan más extendidos en los países desarrollados y es en estos donde la enfermedad presenta una mayor incidencia y constituye un notable problema de salud pública (Vaqué, 2002). Si bien durante todo el año hay notificaciones, 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.

La cadena epidemiológica (**Figura 5**) en la enfermedad del legionario incluye un reservorio primario que comprende el medio acuático natural y otro secundario formado por los sistemas hídricos artificiales. A partir de éstos últimos, la bacteria puede llegar al hospedador humano mediante varios mecanismos de transmisión. Se barajan tres mecanismos de transmisión distintos: inhalación de aerosoles, aspiración y aplicación directa.

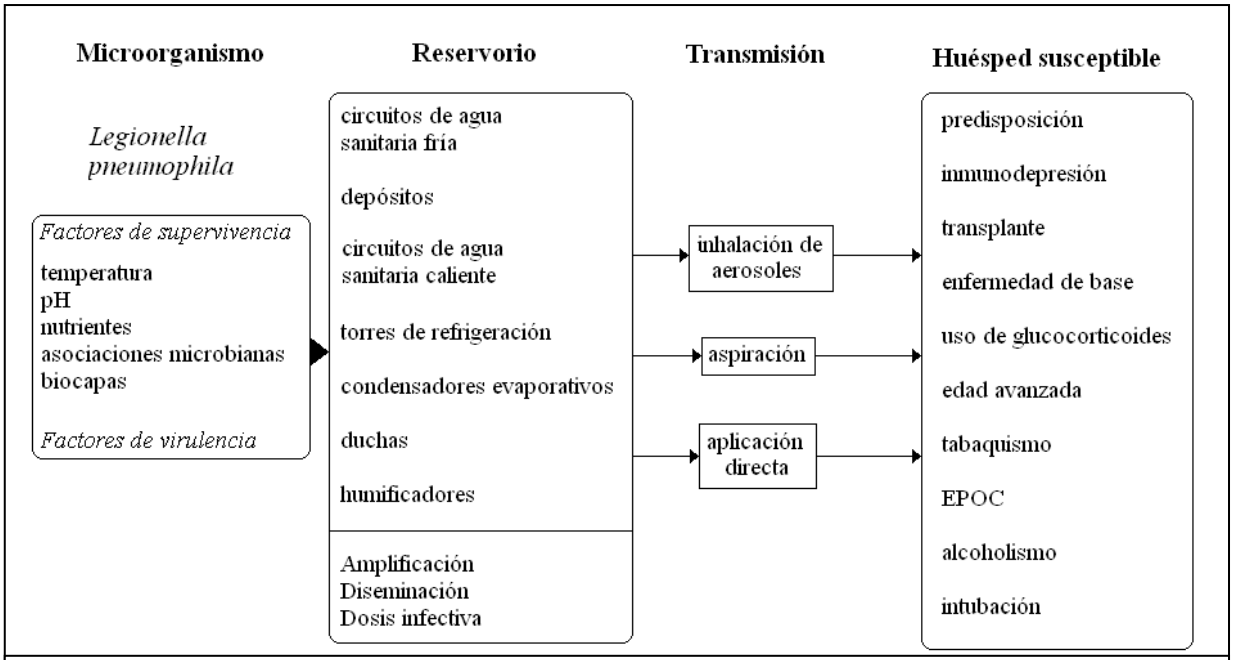


Figura 5. Esquema de la cadena epidemiológica de la enfermedad del legionario (Fields, 2002)**.**

La inhalación de aerosoles se considera la vía de transmisión de mayor trascendencia epidemiológica. Existe una amplia documentación de legionelosis asociadas a la inhalación de aerosoles diseminados por torres de refrigeración y condensadores evaporativos, si bien no se conoce con certeza el riesgo que cabe atribuir a estas instalaciones en la generación de la enfermedad. Esta vía de diseminación tiene especial importancia en los brotes de legionelosis comunitaria y en los casos esporádicos, pero es menos relevante en el ámbito hospitalario (Vaqué, 2002).

Por otro lado, Yu (Yu, 2000) defiende la aspiración como el principal mecanismo de transmisión, apoyándose más en evidencias circunstanciales que en pruebas experimentales claras.

Mediante estas vías de transmisión, las partículas microbianas pueden llegar al alveolo pulmonar, donde quedan retenidas y pueden producir la enfermedad (Vaqué, 2002).

Como último posible modo de transmisión, hay que hablar de la aplicación directa del microorganismo en áreas corporales susceptibles. Aunque es muy infrecuente, este mecanismo se puede dar en situaciones como la utilización de agua contaminada durante el lavado de una herida quirúrgica.

No se ha demostrado la transmisión de persona a persona, por lo que no es necesario aplicar medidas de aislamiento de los enfermos.

3. PATOGENICIDAD

La característica principal de la patogénesis de *Legionella* es su capacidad para multiplicarse intracelularmente. En su hábitat natural se multiplica, fundamentalmente, en el interior de protozoos de vida libre. Podría suponerse que una bacteria capaz de sobrevivir a la fagocitosis y lisis dentro de un protozoo, e incluso capaz de multiplicarse, está paralelamente seleccionada para sobrevivir a la fagocitosis por un macrófago alveolar cuando accidentalmente llega al pulmón humano.

Los factores de virulencia que facultan a *Legionella* para la multiplicación intracelular tanto en macrófagos como en protozoos en las diferentes etapas del proceso (endocitosis, vacuolizaciónk multiplicación y liberación) son resumidos en la **Tabla 2**.

Hospedador / Etapa	Protozoo	Macrófago
Entrada al hospedador	Fagocitosis convencional o en espiral.	
	1. Mediada por receptor. 2. Requiere *dot/icm.* 3. Receptor Gal/Gal/Nac.	1. Dependiente de actina. 2. Requiere *dot/icm*.
Vacuolización y Multiplicación	1. Forma replicativa. 2. Fusión con retículo endoplasmático. 3. Síntesis de ppGpp. 4. Expresión de genes de la fase estacionaria. 5. Movilidad intracelular.	
Salida del hospedador	Necrosis: formación de poros	Apoptosis. Necrosis: formación de poros

Tabla 2. Ciclo intracelular de *L. pneumophila* en protozoos y macrófagos humanos (Swanson, 2000).

4. SIGNIFICADO CLÍNICO

Existen dos manifestaciones clínicas de la legionelosis, una forma neumónica conocida como enfermedad del legionario y una enfermedad febril, no neumónica, llamada fiebre de Pontiac. Esta última, cursa como un proceso agudo, autolimitado, de tipo gripal y tiene un período de incubación de 24 a 48 horas. La enfermedad (malestar, fatiga, mialgias y, en menor medida, fiebre y cefaleas) dura de dos a cinco días y únicamente requiere tratamiento sintomático, no antibioticos (Yu, 2001).

Enfermedad del legionario.

Se trata de la manifestación más grave de la infección por *Legionella*. Es una neumonía potencialmente grave que, al tratarse de una neumonía atípica, no cursa con una sintomatología definida, aunque algunos estudios demuestran que hay ciertos datos clínicos especialmente útiles en el diagnóstico de la neumonía por *Legionella* adquirida en la comunidad que, a pesar de su inespecificidad, constituyen un perfil clínico que debe hacer sospecharla (**Tabla 3**). El diagnóstico definitivo es el diagnóstico microbiológico.

Una información muy valiosa que se debe recabar durante la anamnesis es la relacionada con los antecedentes epidemiológicos, tales como viajes, estancia en hoteles y hospitales y exposición a sistemas generadores de aerosoles (Fernández, 2002).

Contexto epidemiológico.
Tabaquismo.
Tratamiento previo con betalactámicos sin respuesta.
Fiebre elevada.
Cefalea.
Alteración de nivel de conciencia.
Diarreas.
Aumento de la creatincinasa.
Hiponatremia.
Tinción de Gram de esputo con polimorfonucleares sin microorganismos.

Tabla 3. Sospecha clínica de la neumonía por *Legionella* (Fernández, 2002).

La fiebre es un signo que aparece en casi todos los casos y puede alcanzar temperaturas que sobrepasen los 40ºC. La tos leve de la neumonía por legionelosis es poco productiva, por lo que es difícil que los pacientes proporcionen muestras de esputo durante los primeros días de la enfermedad. Los trastornos gastrointestinales pueden ser acusados y cursan con dolor abdominal, náuseas y vómitos. También puede producir alteraciones neurológicas, siendo las más habituales confusión y alteración del estado mental. La diarrea y la hiponatremia son significativamente más frecuentes en la enfermedad del legionario que en otras formas de neumonía. La hiponatremia es más común en los casos graves (Yu, 2001).

La enfermedad del legionario se suele incluye en el diagnóstico diferencial de la neumonía atípica, junto con las infecciones producidas por *Chlamydia pneumoniae, C. psittaci, Mycoplasma pneumoniae, Coxiella burnetii* y algunos virus (Yu, 2001).

Tratamiento

La mayor parte de las legionelas producen β-lactamasa, de modo que las penicilinas y cefalosporinas no están recomendadas como agentes quimioterápicos (Edelstein, 1995).

En el brote de legionelosis de 1976, se comprobó que los casos tratados con eritromicina y tetraciclina presentaron una evolución más favorable que los tratados con otros agentes. El hecho de que *Legionella* sea un patógeno intracelular proporciona la base biológica del éxito de estos antibióticos, dada su elevada penetración intracelular (Yu, 2001).

Los nuevos macrólidos y las quinolonas son en la actualidad los medicamentos de elección, y han desplazado a la eritromicina. Cuando se comparan con la eritromicina, los nuevos fármacos muestran una mayor actividad tanto *in vitro* como intracelularmente, y alcanzan concentraciones superiores en las secreciones respiratorias y en tejido pulmonar (Edelstein, 1998). Si se requiere un tratamiento alternativo los antibióticos recomendados son la tetraciclina y sus análogos (Yu, 2001).

5. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

Las neumonías causadas por *Legionella* no son, desde un punto de vista clínico, suficientemente diferentes de las causadas por otros agentes como para poder fundamentar el diagnóstico sobre datos clínicos, por lo que resulta necesario recurrir a procedimientos de laboratorio (Mellado, 1998).

Desde el primer momento se evidenció la dificultad de *Legionella* para crecer en medios de cultivo convencionales. Por este motivo, los diagnósticos fueron poco frecuentes y la legionelosis se consideró una causa infrecuente de neumonía, ligada casi exclusivamente a brotes comunitarios o nosocomiales (Salleras, 2002).

Este concepto cambió cuando, a mediados de 1990, se introdujo en el mercado una prueba diagnóstica relativamente simple que permitía confirmar un caso de legionelosis a partir de una muestra de orina. Este nuevo método diagnóstico hizo que aumentara la incidencia conocida de la enfermedad y que cambiaran algunos conceptos establecidos hasta entonces sobre la clínica y la epidemiología. Los casos esporádicos pasaron a ser mucho más frecuentes que los asociados a brotes y la infección por *Legionella* se convirtió en la segunda o tercera causa de neumonía de etiología bacteriana (Salleras, 2002).

El diagnóstico de la legionelosis se basa, en la actualidad, en el cultivo de muestras respiratorias, inmunofluorescencia directa, serología y detección de antígeno en orina. A pesar de la variedad de técnicas que pueden emplearse, es difícil establecer ciertos datos de la epidemiología como son la incidencia o la proporción de casos de la enfermedad. Uno de los motivos es que cada una de las pruebas diagnósticas presenta unos valores de sensibilidad distintos, de manera que la frecuencia de la enfermedad varía en función de la técnica utilizada. Además, ciertas técnicas no están

incorporadas a la metodología diagnóstica de muchas de las series sobre neumonías de la comunidad o nosocomiales. A todo esto hay que unir que no todos los métodos diagnósticos se encuentran disponibles en los laboratorios de muchos centros hospitalarios (Sabrià, 2002).

5.1 Cultivo

El aislamiento del microorganismo por cultivo está considerado la técnica de referencia en el diagnóstico microbiológico de la legionelosis. Es la prueba más específica porque permite la detección de todas las especies y serogrupos de *Legionella*. Para su realización se utiliza un medio sólido, agar BCYE, tanto en su versión enriquecida como selectiva. Resulta conveniente hacer el cultivo en los dos tipos de medios. Con el empleo del medio selectivo se consigue eliminar la flora comensal que albergue la muestra y con el enriquecido se permite el crecimiento de algunas especies de *Legionella* que pueden ser inhibidas por los antibióticos en el primer caso (Vickers, 1987). *Legionella* puede ser aislada de varios tipos de muestras, entre las que se incluyen sangre, tejido pulmonar y muestras respiratorias, aunque estas últimas, como esputos, lavados broncoalveolares o aspirados bronquiales, son las muestras de elección (Murdoch, 2003).

Esta técnica, a pesar de tener una alta especificidad (100%), presenta dos problemas fundamentales:

- Baja sensibilidad (10-80%, según las series consideradas) (Murdoch, 2003)
- Largo tiempo de incubación, que retrasa el diagnóstico.

Además, cuando el paciente se diagnostica en un estadio muy precoz de la enfermedad, algo frecuente en situaciones epidémicas dada la alta sospecha clínica, esta técnica es poco adecuada debido a que muy pocos pacientes presentan tos productiva (Maiwald, 1995). Aún así, independientemente del momento de la enfermedad, la expectoración no es un síntoma característico de una neumonía atípica, caso de la legionelosis.

Calidad de la muestra respiratoria.

Los criterios propuestos por Murray y Washington en 1975 para seleccionar las muestras de esputo apropiadas para el diagnóstico de neumonía (**Tabla 4**), han sido discutidos en el caso de las muestras procedentes de pacientes con sospecha de neumonía por *Legionella*. Ingram y Plouffe (1994)

recomiendan cultivar todas las muestras para el diagnóstico de legionelosis. En su estudio, los resultados demuestran que del 47 al 84% de los cultivos positivos para *L. pneumophila* habrían sido desechadas según los criterios establecidos. Un estudio posterior realizado en España (Ferrer, 1995) obtiene un 66% de aislamientos de *Legionella* a partir de esputos que habrían sido descartados y propone que se realicen cultivos sistemáticos en medio selectivo para *Legionella* spp., independientemente del grado de purulencia de la muestra.

GRUPO	**Nº de células por campo**	
	Leucocitos	**Células epiteliales**
6	>25	<25
5	>25	10-25
4	>25	<10
3	>25	>25
2	10-25	>25
1	<10	>25

Tabla 4. Clasificación de la muestra de expectoración por tinción de Gram. Murray y Plouffe recomiendan no cultivar los grupos 1, 2 y 3.

5.2 Inmunofluorescencia directa

La inmunofluorescencia directa (*direct fluorescent antibody*, DFA) fue el primer método utilizado para detectar *Legionella* en tejidos y en secreciones respiratorias (Fields, 2002).

Tiene la ventaja de proporcionar un resultado en 2-4 h, pero requiere emplear una técnica relativamente compleja que debe llevarse a cabo por personal de laboratorio experimentado (Murdoch, 2003). Otra ventaja es que puede detectar la bacteria varios días después de comenzar el tratamiento antimicrobiano (Fields, 2002).

La sensibilidad de la DFA es variable según los distintos estudios pero siempre considerablemente menor que la del cultivo, y poco conocida para especies distintas a *L. pneumophila*. En secreciones del tracto respiratorio inferior, se han informado sensibilidades desde un 25% (Zuravleff, 1983) hasta un 62% (Edelstein, 1980) o un 68% (Saravolatz, 1981) en el mejor de los casos.

La especificidad de la DFA se estima alrededor del 95%. Se pueden obtener resultados falsos positivos al producirse reacciones cruzadas con otras bacterias, entre las que se encuentran *Bacteroides fragilis* y especies de *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* y *Flavobacterium*.

Los problemas de sensibilidad y especificidad han limitado el uso de la DFA, y un resultado positivo no se acepta como diagnóstico en ausencia de otra prueba que apoye la evidencia de una infección por *Legionella* (Murdoch, 2003).

5.3 Serología

Las técnicas serológicas determinan la presencia de anticuerpos contra *Legionella* en muestras de suero. Para realizar el diagnóstico es necesario recoger dos muestras de suero del mismo paciente tomadas, al menos, con tres semanas de separación. Tras su estudio, se considerará diagnóstico positivo un aumento de cuatro órdenes en el título de anticuerpos.

Aunque se han desarrollado múltiples técnicas serológicas, las más utilizadas son las de inmunofluorescencia indirecta, por dar un mayor rendimiento y alcanzar sensibilidades del 80% y una especificidad del 95%.

El diagnóstico serológico es una herramienta epidemiológica válida pero sólo permite un diagnóstico retrospectivo, por lo que tiene poca repercusión en la decisión clínica. En la mayoría de los casos, un incremento de cuatro órdenes en el título de anticuerpos es detectado en 3-4 semanas, pero en otros casos, esto puede llevar más de 10 (Murdoch, 2003).

Otra desventaja de esta prueba es la incapacidad para detectar fielmente todas las especies y serogrupos de *Legionella*. Aunque la seroconversion a *L. pneumophila* serogrupo 1 está considerada como altamente predictiva de la enfermedad, la sensibilidad y especificidad de la seroconversión a otras especies y serogrupos no ha sido rigurosamente confirmada. Además, se han producido reacciones cruzadas dando resultados falsos positivos en pacientes con infección por otras especies y serogrupos de *Legionella*, e incluso por bacterias pertenecientes a otras familias (Murdoch, 2003).

5.4 Antígeno urinario

Sin duda, el mayor avance en el diagnóstico de la enfermedad del legionario ha sido la detección del antígeno en orina, que ha permitido el reconocimiento precoz de algunos brotes epidémicos. El antígeno detectado es un componente termoestable de la porción del lipopolisacárido de la pared celular de *Legionella pneumophila* serogrupo 1. Según un estudio prospectivo que analiza la duración del antígeno bacteriano en 61 muestras de orina, la persistencia del mismo no supera los 60 días en la mayoría de los pacientes pero es mayor en pacientes inmunodeprimidos (Sopena, 2002).

Los kits comerciales que utilizan metodologías de RIA y EIA han sido utilizados durante varios años y han tenido características de diseño similares. Recientemente, se ha desarrollado un ensayo inmunocromatográfico con una sensibilidad y especificidad similares al EIA. Este test es fácil de realizar y proporciona resultados en 15 minutos. Para la detección de *L. pneumophila* serogrupo 1, el test de antígeno en orina tiene un rango de sensibilidad del 70-100% y una especificidad aproximada del 100%. La sensibilidad se puede incrementar en un 20% si antes de realizar el test la orina se concentra (10X). La mayor desventaja de este test es su incapacidad para detectar organismos distintos a *L. pneumophila* serogrupo 1.

La antigenuria de *Legionella* puede ser detectada desde un día después que se instauren los síntomas y persiste de días a semanas. Los antígenos solubles de *Legionella* se han detectado en muestras distintas a la orina, como esputos, tejido pulmonar, suero y fluido pleural, aunque el uso de estas muestras no ha sido totalmente evaluado (Murdoch, 2003).

El test del antígeno en orina es actualmente una herramienta establecida y válida para el diagnóstico de la enfermedad del legionario, particularmente en las regiones donde *L. pneumophila* serogrupo 1 es la causa más común de la enfermedad. En los lugares donde sólo una pequeña parte de las infecciones son causadas por esta bacteria, el test presenta una menor contribución (Murdoch, 2003).

6. DIAGNÓSTICO BASADO EN LA DETECCIÓN DE ADN

6.1 Detección de DNA por PCR ordinaria

Si atendemos a los datos que se tienen hasta ahora, las nuevas técnicas moleculares, y en concreto el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han aportado resultados muy esperanzadores en el campo del diagnóstico clínico.

Recientemente, las técnicas de detección de DNA se han mostrado prometedoras en el diagnóstico rápido de la infección por *Legionella*. La PCR permite la amplificación específica de pequeñas cantidades del DNA de la bacteria, proporciona resultados en un corto período de tiempo y tiene el potencial de detectar infecciones causadas por cualquier especie y serogrupo de *Legionella*. (Murdoch, 2003).

Las muestras del tracto respiratorio inferior procesadas por PCR han mostrado repetidamente tener una sensibilidad igual o mayor que el cultivo. De hecho, según Murcoch, la PCR podría ser considerada la técnica de elección para pacientes que producen esputo. El papel de la PCR en otro tipo de muestras está menos claro. El DNA de *Legionella* puede ser detectado en muestras de orina, suero y leucocitos obtenidas de pacientes con la enfermedad del legionario con sensibilidades del 30-86% (Murdoch, 2003). Es probable que esta técnica experimente un aumento de la sensibilidad cuando las muestras se obtienen en la fase temprana de la enfermedad y cuando se consiga más de una muestra de cada paciente **(**Murdoch, 1996).

Las dianas de amplificación que se han utilizado hasta el momento para desarrollar tests de PCR son los genes que codifican para 5S rRNA, 16S rRNA y *mip.* En los dos primeros casos las dianas son específicas del género y el gen *mip* es específico de *L. neumophila.* Sin embargo, se han obtenido algunos resultados falsos positivos que revelan homologías con especies de *Acinetobacter*, *Gemella* spp y una proteobacteria indefinida (Fields, 2002).

El resultado de la amplificación se ha visualizado mediante tinción de los productos de la reacción con bromuro de etidio en electroforesis con geles de agarosa, o bien, mediante sondas de hibridación inmovilizadas en membranas de nylon con cebadores biotinilados **(**Fields, 2002).

6.2 Detección de DNA por PCR en tiempo real

Recientemente se ha ideado una nueva técnica molecular basada en la PCR denominada *amplificación con desplazamiento de cadena (SDA) y detección homogénea en tiempo real mediante un sistema de sonda de ADN de segunda generación*, *BDProbeTecET*. Esta técnica combina la amplificación del ADN con el revelado simultaneo mediante la emisión de fluorescencia.

Fundamento de la técnica.

El proceso se divide en dos fases: generación de la diana y amplificación exponencial de la diana.

Generación de la diana.

En la fase de generación de la diana, una doble cadena de ADN molde es desnaturalizada para permitir la hibridación de los cebadores. En esta técnica se emplean dos tipos de cebadores (**Figura 6**):

- B (B1 y B2): cebadores convencionales,
- S (S1 y S2): *bumpers*. Son cebadores especiales que hibridan con el ADN molde en una zona más interna a continuación de los cebadores convencionales. Su secuencia consta de un extremo 3´ que hibrida con el ADN molde y un extremo 5´ que queda suelto y contiene una secuencia diana de una enzima de restricción con la que se modificará la secuencia original del ADN molde.

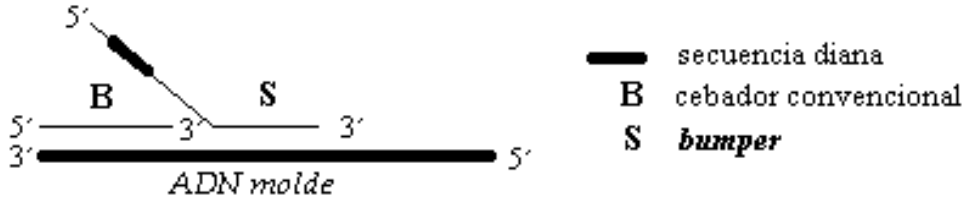


Figura 6. Cebadores.

En presencia de ADN polimerasa y una mezcla de dNTP (desoxinucleótidos trifosfatados), se generan simultáneamente los productos de extensión de S1 y B1 (**Figura 7**). Este proceso desplaza los productos de S1, a los que pueden hibridar los cebadores de la cadena complementaria, B2 y S2. La extensión simultanea de los dos cebadores produce la especie 6 (**Figura 7.A**).

Amplificación exponencial de la diana.

La especie 6 es capaz de llevar a cabo la fase de amplificación exponencial de la diana (**Figura 7.B**). Esta molécula es sustrato para la enzima de restricción, que forma parte de la mezcla, y que reconoce un sitio de restricción en la doble cadena. Este sitio de restricción contiene un nucleótido dCTP sulfatado incorporado durante la fase de amplificación de la diana en la mezcla de nucleótidos. Su presencia impide que la enzima corte la doble cadena: sólo puede actuar sobre la cadena que no contiene el nucleótido sulfatado. A continuación la polimerasa se une al sitio cortado y comienza la síntesis de una nueva cadena mientras simultáneamente la cadena se desplaza aguas abajo.

Esta etapa recrea la especie 7 de doble cadena, y los cortes reiterados y procesos de desplazamiento se repiten. Las cadenas desplazadas son capaces de unirse a los cebadores de las cadenas complementarias, con lo que se produce la amplificación exponencial. A estos productos de cadena simple se une la sonda para la detección en tiempo real (**Figura 8.A**).

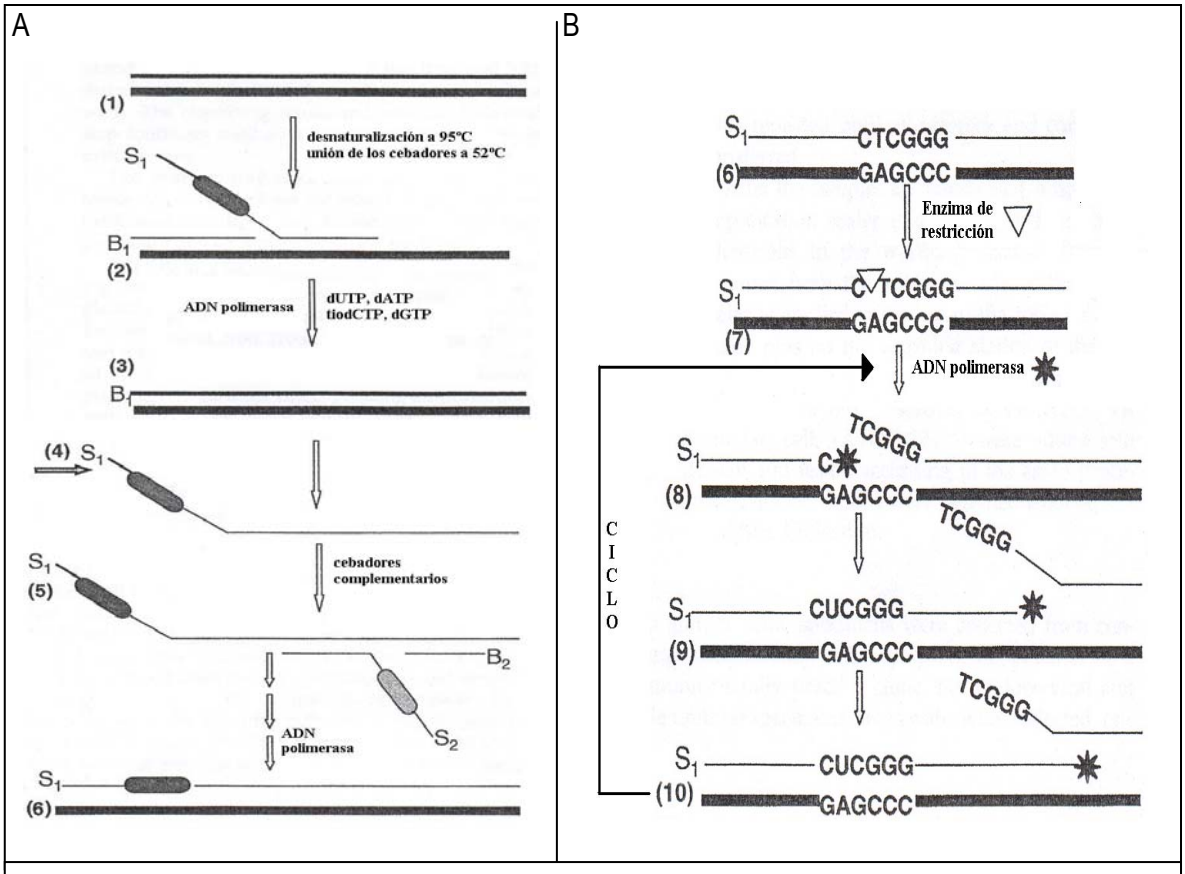


Figura 7.A. Generación de la diana. **B.** Amplificación exponencial de la diana. **(nº):** número de especie.

En la reacción SDA está presente una sonda de DNA de cadena simple marcada con fluoresceína y rodamina (**Figura 8.B**). La región comprendida entre ambos marcadores tiene la estructura de un bucle de doble cadena. El bucle contiene una secuencia que es reconocida por la enzima de restricción. Antes de la SDA las moléculas marcadoras se encuentran muy próximas físicamente, de manera que la energía emitida por la excitación de la fluoresceína es absorbida por la rodamina y el efecto neto es que se detecta muy poca energía emitida por la fluoresceína. Después de la SDA, la sonda se convierte en una especie de doble cadena que la enzima de restricción es capaz de cortar. Esta separación física de las dos moléculas marcadoras permite que toda la energía emitida por la fluoresceína sea detectada, y esta emisión es indicativa de una amplificación específica atribuible a la presencia de la secuencia diana.

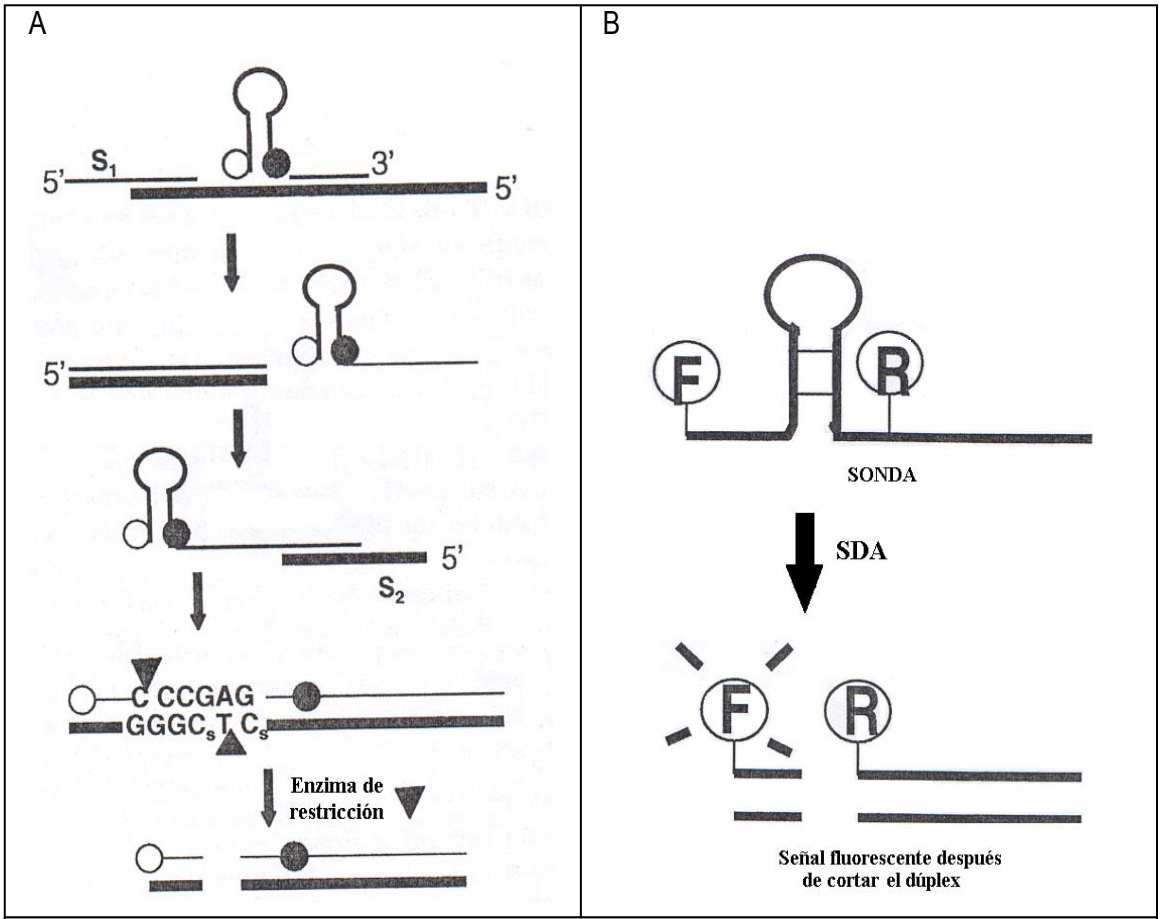


Figura 8. A. Conversión de la sonda detectora durante la SDA. **B.** Sonda detectora

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la utilidad de las técnicas de amplificación y detección de ADN de Legionella spp. en el diagnóstico de neumonía por esta bacteria dentro de un contexto de un brote epidémico mediante el empleo de las siguientes técnicas:

- PCR ordinaria: sobre muestras respiratorias y de orina
- PCR en tiempo real (*ProbeTec*®): sobre muestras respiratorias.

2

MATERIAL Y MÉTODOS

1. PACIENTES Y MUESTRAS

Entre los días 8 y 22 de Julio de 2001 tuvo lugar en Murcia un brote de enfermedad del Legionario en el que se vieron afectadas alrededor de 650 personas con un total de 449 casos confirmados. La investigación epidemiológica situó el origen del brote en una torre de refrigeración situada en la zona noroeste de la ciudad. La hospitalización fue necesaria en el 64% de todos los casos atendidos y en el 74% de los casos confirmados.

En el Hospital Morales Meseguer se atendieron un total de 630 pacientes con sospecha clínica de legionelosis. Para la realización del diagnóstico microbiológico se estableció un protocolo de recogida de muestras de forma que, de cada uno de los pacientes, se solicitó el envío al laboratorio de Microbiología de muestras de orina, sangre para hemocultivo, muestras respiratorias en aquellos pacientes con tos productiva y dos sueros obtenidos en fase aguda (dentro de la 1ª ó 2ª semana tras la exposición) y en fase convaleciente (al menos tres semanas después). Se obtuvieron un total de 570 muestras de orina, 630 pares de sueros, 630 hemocultivos y 166 esputos. Todas las muestras fueron, tras el procesamiento inicial, alicuotadas en tubos eppendorf y guardadas a –70ºC.

2. DIAGNÓSTICO CONVENCIONAL

2.1. Cultivo

Se obtuvieron un total de 166 muestras de esputos correspondientes a 154 pacientes. Todas las muestras fueron aceptadas sin realizarse selección de las mismas (Ingram y Plouffe, 1994) según los criterios de calidad del esputo (Murray y Washington, 1975). Las muestras fueron sembradas en el medio específico para cultivo de *Legionella* BCYE (*buffered Charcoal-yeast extract agar*; *Analizer®*) enriquecido y selectivo. Cada una de las muestras fue inoculada sobre los medios de cultivo de la siguiente forma:

1.- Directamente
2.- Tras dilución 1/10 en Mueller Hinton Broth (MHB)
3.- Tras descontaminación con solución ácida.

Las placas fueron incubadas en estufa a 35ºC con un 3% de CO_2, observándose cada 3 días durante tres semanas antes de dar un resultado definitivo. Tras la observación, las colonias

sopechosas fueron resembradas simultáneamente en agar sangre y agar BCYE. Aquellas colonias que crecieron en el medio específico pero no en agar sangre fueron identificadas mediante inmunofluorescencia directa (Monofluo™ *Legionella pneumophila* IFA Test Kit, *BIO-RAD*).

2.2. IFD

A un total de 62 muestras de esputos se les realizó IFD con el kit comercial "Monofluo™ *Legionella pneumophila* IFA Test Kit" de *BIO-RAD Laboratories*, siguiendo las instrucciones del fabricante. De cada muestra de esputo se seleccionó la porción más viscosa y se realizó una extensión sobre portaobjetos. Las extensiones fueron secadas al aire y fijadas con formalina al 10% durante 10min. Tras lavado con agua desionizada se realizó la tinción fluorescente con el reactivo MONOFLUO™ y se incubó durante 30min a 35ºC en cámara húmeda. Tras la incubación se eliminó el exceso de reactivo y se realizaron 2 lavados en agua desionizada. El portaobjetos se secó al aire y se observó en microscopio de fluorescencia.

3. AMPLIFICACIÓN DE ADN EN MUESTRAS RESPIRATORIAS

Se estudiaron 46 muestras respiratorias procedentes de 45 pacientes asistidos en el Hospital Morales Meseguer durante la época del brote de legionelosis. Se seleccionaron aquellas muestras cuya cantidad fue suficiente para poder comprobar la reproductividad del ensayo.

3.1. Detección de ADN de *Legionella* mediante PCR ordinaria: *Legionella DNA presence SBF39* (*Symbiosis*).

Para detectar la presencia de *Legionella* en las muestras respiratorias se utilizó un kit comercializado de la casa SYMBIOSIS, *Legionella DNA presence SBF39*, que contiene los reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción de amplificación y una sonda específica para la detección cualitativa de ADN de *Legionella.*

El fragmento de ADN amplificado corresponde al gen de ARNr 16S, el cual está presente en todas las

especies del género *Legionella*. Este gen se encuentra secuenciado parcialmente y la secuencia se encuentra disponible en http://getentry.ddbj.nig.ac.jp/cgi-bin/get_entry2.pl?database=ddbj&query=af129524 (11/09/03). El fragmento amplificado en este estudio dio un tamaño de banda electroforética de 386 pares de bases. Los productos de amplificación, conjugados con biotina en el extremo 5´, fueron hibridados con una sonda específica sintetizada con la inserción de una molécula de fluoresceína.

Para realizar la hibridación se utilizó un kit complementario denominado *Colorimetric Detection of Nucleic Acids*. Los híbridos se inmovilizaron en pocillos recubiertos con estreptavidina y se detectaron utilizando un anticuerpo anti-fluoresceína conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) y a un sustrato cromogénico (OPD). La producción de color se leyó al final de un período de incubación en un lector ELISA ordinario.

a. Extracción de ADN

La extracción del ADN de *Legionella* a partir de muestras de respiratorias se realizó en dos etapas: en primer lugar se hizo una solubilización del expectorado y en segundo lugar, la extracción del ADN propiamente dicha.

a.1. Solubilización del expectorado

Se trabajó a partir de un volumen de 200µl, aunque en algunos casos esto no fue posible debido a la mucosidad de la muestra. En estos casos se partió de un volumen superior, hasta 350µl, ajustándose de forma proporcional, en cada caso, el volumen de los reactivos descritos a continuación. Como controles positivos de la extracción se emplearon muestras proporcionadas por la casa comercial.

Para solubilizar el esputo se partió de un volumen de muestra de 200µl dispensado en un tubo de 1.5ml. A esto se añadió 100µl de N-acetil cisteína al 2% en tampón PBS, 0.1M y pH 6.8. El tubo se incubó durante 20min a 37ºC y se agitó en el vortex a los 0, 10 y 20min.

A continuación se añadieron 100µl de NaOH al 4% y se incubaron durante 20min a 37ºC, agitando en el vortex a los 0, 10 y 20min. Tras esto se adicionaron 200µl de Tris/HCl 1M pH 7.0 para tamponar la muestra. El contenido del tubo se mezcló bien en el agitador y se centrifugó a 14000rpm

durante 30min a temperatura ambiente. Por último, se eliminó el sobrenadante y se conservó el precipitado.

El precipitado fue conservado a -20ºC hasta realizar la extracción del ADN.

a.2. Extracción de ADN propiamente dicha

La extracción de ADN se realizó con el kit comercializado *QIAmp DNA Mini Kit* (Qiagen®) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Al tubo donde se encontraba el precipitado se añadieron 180µl de tampón ATL, seguidos de 40µl de proteinasa K (no se utilizó la enzima proporcionada por el kit, sino proteninasa K alicuotada y almacenada a –20ºC de Sigma®) utilizada a una concentración de 10mg/ml. Tras agitar en el vortex, se incubó a 56ºC hasta que el precipitado estuvo completamente lisado (1-2 horas). Durante la incubación se agitó ocasionalmente el tubo para dispersar la muestra. Para eliminar las gotas de la tapadera se daba un golpe de centrífuga.

Después, se añadieron 200µl de tampón AL a la muestra, se mezcló en el agitador durante 15 segundos y se incubó 10min a 70ºC. De nuevo, se dío un golpe de centrífuga al tubo para eliminar las gotas de la tapadera.

Seguidamente, se añadieron 200µl de etanol (96-100%) y se agitó durante 15 segundos. Tras agitar, se dió un golpe de centrífuga.

Cuidadosamente, se trasvasó toda la mezcla del tubo a una columna de centrífuga proporcionada por el kit, colocada dentro de un tubo colector de 2ml. Tras cerrar el tapón, se centrifugó a 8000rpm durante 1min. A continuación se colocó la columna de centrífuga en un nuevo tubo colector de 2ml, y se desechó el tubo que contenía el filtrado.

Al abrir la columna de centrífuga, se añadieron 500µl de tampón AW1 sin mojar el borde, se cerró el tapón y se centrifugó a 8000rpm 1min. Después de colocar la columna de centrífuga en un nuevo tubo colector de 2ml, se eliminó el tubo que contenía el filtrado.

Cuidadosamente, se abrió la columna de centrífuga y se añadieron 500µl de tampón AW2, se cerró el tapón y se colocó en la centrífuga a 14000rpm durante 3min. Al finalizar, se introdujo la columna en un nuevo tubo colector de 2ml y se desechó el tubo que contenía el filtrado.

Finalmente, la columna de centrífuga se instaló en un tubo limpio de 1.5ml y se eliminó el tubo colector con el filtrado. Para eluir el ADN, se abrió la columna de centrífuga y se añadieron 100µl de tampón AE. Durante 5min se incubó a temperatura ambiente y por último se centrifugó a 8000rpm 1min. El volumen obtenido contenía el producto de la extracción.

Las muestras fueron conservadas a -20ºC hasta su utilización.

b. <u>Amplificación del ADN</u>

Durante la etapa de amplificación se tomaron las precauciones necesarias para evitar la contaminación de las muestras.

Atendiendo a la ecología de *Legionella* spp., hay que tener en cuenta su ubicuidad en ambientes acuáticos. Esto implica que hay que prestar una especial atención en el chequeo de todos y cada uno de los reactivos que potencialmente puedan albergar el crecimiento de la bacteria ya que, aunque éstos se esterilicen, el ADN puede permanecer y dar lugar a falsos positivos a la hora de aplicar las técnicas de amplificación, problema con el que nos hemos encontrado durante el desarrollo de este trabajo.

Se recomienda, por tanto, hacer controles de contaminación, aplicando la misma técnica de PCR que se va a utilizar con las muestras clínicas, a todos los reactivos que se empleen, ya sean caseros o comercializados, puesto que en este último caso ya se han descrito problemas en ese sentido (A. van der Zee, 2002).

La reacción de PCR se realizó con los reactivos proporcionados por el kit comercial *Legionella DNA presence SBF39* (*Symbiosis*®), en un volumen final de 50µl que contenía 10µl del ADN extraído y el resto de los reactivos de amplificación en la proporción indicada en la **Tabla 5**.

Reactivos	Volumen (µl)
Mezcla de amplificación	34.7
Cebadores	5.0
Taq polimerasa (5U/µl)	0.3
Volumen total	40.0

Tabla 5. Componentes de la mezcla de amplificación.

La reacción de amplificación se realizó en un termociclador modelo *GeneAmp PCR System Perkin Elmer Roche Diagnostic System*, siguiendo las condiciones indicadas en la **Figura 9**.

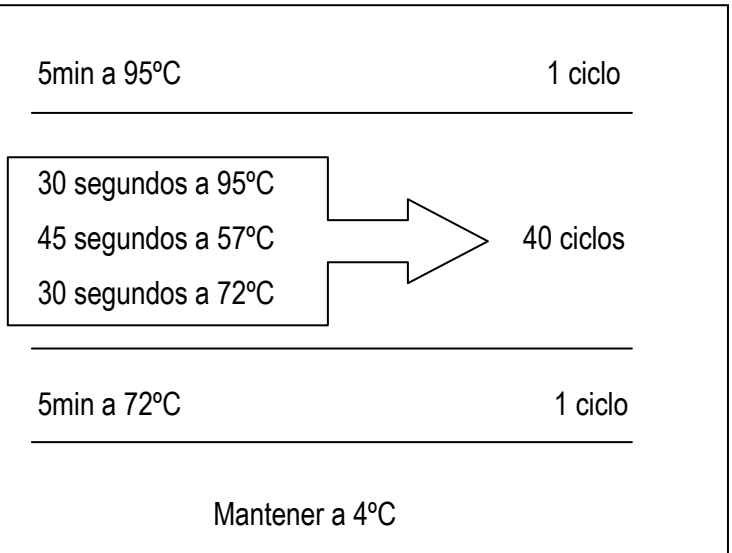


Figura 9. Programa de amplificación.

c. <u>Detección de los productos amplificados</u>

c.1. <u>Electroforesis</u>

El análisis de los productos de PCR se realizó en geles de agarosa al 1%, en cuyos pocillos se cargaron 5µl del producto de la reacción de PCR, 5µl de agua y 2µl de tampón de carga 6X. La

electroforesis se realizó en una cubeta horizontal con tampón TAE 1X a un voltaje de 70V durante 90min.

Los geles se tiñeron con bromuro de etidio 0.5µg/ml en TAE 1X durante 15min y se visualizaron en un analizador de imágenes de la casa *BIO-RAD*, modelo *Gel Doc 1000.* El tamaño de los amplificados se estimó utilizando un marcador de peso molecular de ADN (*DNA Molecular Marker VI, Roche Diagnostic Corporation*®)

c.2. Hibridación

La detección de los productos amplificados se realizó también mediante hibridación utilizando el kit comercial *Colorimetric Detection of Nucleic Acids* (*Symbiosis*®).

La mezcla de hibridación se preparó inmediatamente antes de usar. Para cada muestra se utilizó 1µl de la solución que contenía la sonda de hibridación y 119µl de la solución de hibridación.

Se dispensaron 120µl de esta mezcla en tubos a los que también se añadieron 5µl de producto amplificado. Se mezcló bien pipeteando 5 veces y esto se incubó durante 5min a 95ºC, seguido de 10min a 37ºC.

Tras esta incubación se transfirieron 45µl de producto hibridado al pocillo correspondiente. Para ello, se tuvieron que atemperar previamente los pocillos de hibridación y colocar en una placa soporte. A continuación, se incubó 60min a 37º. Con el fin de evitar la evaporación de la solución líquida durante la incubación, ésta se cubrió con una tapadera adhesiva.

Tras la incubación, se realizaban los lavados de la placa: 8 veces con tampón de lavado 1X.

Llegados a este punto, la mezcla estaba preparada para que se dispensaran en ella 100µl del anticuerpo detector en solución a cada pocillo, excepto al blanco. La solución del anticuerpo detector se preparaba 10min antes de usar.

Solución del anticuerpo. Cada 100µl debía contener 96µl del diluyente del anticuerpo, 3µl de suero bovino fetal (FCS) y 1µl del anticuerpo. Antes de dispensar en los pocillos, se mezclaba cinco veces

con la pipeta. A continuación, se incubaba la placa 30min a temperatura ambiente en un agitador de placas. De nuevo, se realizaban 8 lavados.

Por último, se añadían 100µl de sustrato a los pocillos, incluyendo el blanco, y se incubaba 30min a temperatura ambiente y en oscuridad. El sustrato se preparaba 10min antes de usar.

Preparación del sustrato. Se disolvía un comprimido de OPD en 3ml de diluyente de sustrato (no se puede utilizar instrumental metálico para ayudar a disolver la pastilla). La mezcla se protegía de la luz y se mantenía a 2-8ºC hasta su empleo.

Para detener la reacción, se añadían 100µl de solución STOP.

3.2. Detección de ADN de Legionella mediante PCR en tiempo real: *ProbeTec®* (*Becton Dickinson®*)

Esta técnica permite realizar una extracción de ADN que será amplificado y revelado simultáneamente mediante una PCR en tiempo real.

a. Extracción de ADN

A diferencia del protocolo seguido en la PCR ordinaria, en este caso, la extracción de ADN se realizó mediante el kit *QIAmp DNA Blood Mini Kit* (*Qiagen®*), sin que las muestras fueran solubilizadas previamente. Se partió de 350µl de cada muestra respiratoria, conservada a -70ºC, trasvasándose a un tubo de 2ml. A esto se añadían 150µl de tampón ASL, 25µl de proteinasa K del kit, 500µl de tampón AL y se agitaba en el vortex. Los tubos se colocaban en una gradilla con tapadera ajustada y se incubaban en un baño de agua a 70ºC durante 15min. Tras el baño se daba un golpe de centrífuga. A continuación se añadían 500µl de etanol y se agitaba vigorosamente utilizando el vortex. Después se daba un golpe de centrífuga.

A una columna de centrífuga contenida en un tubo colector de 2ml se trasvasaban 700µl del esputo solubilizado que se centrifugaba a 16200g durante 1min. El tubo colector con el filtrado se

descartaba. Esta última etapa se repetía con los 700µl restantes, añadiéndolos a la columna ya utilizada.

Colocando el filtro en un nuevo tubo colector, se adicionaban 500µl de tampón AW1 a la columna y se centrifugaba 1min a 16200g. De nuevo, se cambiaba el filtro a un nuevo tubo colector y se añadían 500µl de tampón AW2 a la columna. Todo esto se centrifugaba 3min a 16200g.

Una vez hecho esto, se añadían 225µl de tampón AE. Se incubaba 1min a temperatura ambiente y se centrifugaba también 1min a 16200g. A continuación se mezclaban 200µl del eluido con 400µl de *Lower Respiratory Sample Diluent* y se agitaba vigorosamente. Por último, se llevaban a ebullición 5min, incluidos los controles, y se dejaban enfriar durante un mínimo de 15min. Antes de continuar con la siguiente etapa, se daba un golpe de centrífuga.

b. Amplificación y revelado

Para esta etapa se trasvasaban 150µl del volumen obtenido en la extracción, a los pocillos que contienen los cebadores y se incubaban a temperatura ambiente durante 20min. Mientras tanto, se preparaban los pocillos de amplificación.

Transcurridos los 20min, se transferían los pocillos a una placa caliente a 72ºC durante 10min. Después de incubar, se trasladaba un volumen de 100µl de cada uno de estos pocillos a los pocillos de amplificación y se introducía inmediatamente la placa en el *ProbeTec* durante 1 hora. La reacción ocurría a 52.5ºC

4. AMPLIFICACIÓN DE ADN EN MUESTRAS DE ORINA

Las precauciones señaladas para las muestras respiratorias, hay que tomarlas igualmente en el caso de las orinas.

Se utilizaron, para este estudio, 25 muestras de orina procedentes de 19 pacientes, 6 proporcionaron 2 muestras de orina y el resto sólo 1.

4.1. Extracción del ADN

La extracción de ADN se realizó partiendo de muestras de orina concentradas 10 veces en un concentrador de macromoléculas para soluciones biológicas (*Minicon concentrator B15*, casa *AMICON*). Para extraer el ADN se empleó un kit comercializado para la limpieza este ácido nucleico, GENECLEAN II (Maiwald, 1995) con el siguiente protocolo.

Se adicionó, a un eppendorf, 350µl de orina y 1050µl de NaI y se mezcló en un vortex. A continuación, se añadieron 4µl de la matriz *glassmilk* y se incubó durante 15min a temperatura ambiente agitando con el vortex cada 2min.

Seguidamente, se centrifugó 30 segundos a 15000rpm y se eliminó el sobrenadante. Para lavar el precipitado, se vertieron 500µl de tampón de lavado *New WASH*, se agitó y se centrifugó nuevamente 30 segundos a 15000rpm. El lavado se realizó tres veces. Con el fin de eliminar cualquier resto del etanol que contiene el tampón de lavado, se sometieron las muestras a 55ºC en un bloque calefactor con los tubos eppendorf abiertos durante 15min.

Para eluir el ADN, se añadieron 20µl de agua (también se puede utilizar tampón TE) al precipitado, se dieron unos golpes suaves al tubo y se centrifugaron 30 segundos a 1500rpm. Por último, se recogió el eluido en un tubo nuevo.

La amplificación del ADN extraído y el revelado por electroforesis se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo descrito para las muestras respiratorias.

5. ESTUDIO ESTADÍSTICO

Según Silva (Silva, 1987), dar los resultados como valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) con un intervalo de confianza del 0.95, es la forma más adecuada de expresar los datos procedentes de un estudio sobre diagnóstico.

Los datos se presentan en una matriz que relaciona los resultados de la técnica estudiada (TÉCNICA) con los obtenidos por las técnicas de referencia establecidas por el CDC (REFERENCIA):

	REFERENCIA		
	+	-	
TÉCNICA+	**A**	**C**	A+C
TÉCNICA -	**B**	**D**	B+D
	A+B	C+D	**A+B+C+D**

El VPP se expresa como el número de resultados positivos tanto por la técnica en estudio como por la que se tome de referencia (A), relacionado con el total de resultados positivos obtenidos por la técnica en estudio (A+C). Este valor indica la probabilidad de que un individuo con resultado positivo en la prueba tenga la enfermedad.

$$VPP = A/(A+C)$$

El VPN se expresa como el número de resultados negativos tanto por la técnica en estudio como por la que se tome de referencia (D), relacionado con el total de resultados negativos obtenidos por la técnica en estudio (C+D). Este valor indica la probabilidad de que un individuo con resultado negativo en la prueba no tenga la enfermedad.

$$VPN = D/(B+D)$$

La sensibilidad, especificidad y concordancia se hallan mediante las siguientes expresiones:

$$SENSIBILIDAD = A / (A+B)$$
$$ESPECIFICIDAD = D / (C+D)$$
$$TOTAL = (A+D) / (A+B+C+D)$$

6. TAMPONES Y SOLUCIONES

TRIS-HCl 1M

- Tris base 121.1g
- H_2O destilada 800ml
- Ajustar a pH 8.0 con HCl
- Esterilizar en autoclave: 121ºC, 15'.

TAE 1X

- Tris·HCl pH 8.0 40Mm
- EDTA pH 8.0 1mM
- Acido acético glacial 40mM

Bromuro de Etidio

- Bromuro de etidio 0.5mg
- H_2O destilada 100ml
- Conservar en oscuridad

Tampón de Carga (6X)

- Azul-bromofenol 0.25%
- Xilen-cianol 0.25%
- EDTA (pH 8.0) 1mM
- Glicerol 50%

Proteinasa K

- Preparar una solución madre de 10mg/ml en H_2O destilada.
- Alicuotar y consevar a –20ºC.

3

RESULTADOS

1. MUESTRAS RESPIRATORIAS

A un total de 46 muestras respiratorias se les realizó amplificación de ADN de *Legionella* spp. mediante PCR utilizando el kit comercializado de la casa *Symbiosis®*, *Legionella DNA presence SBF39*, el cual amplifica un fragmento del gen que codifica para la molécula de ARNr 16S de la bacteria. Los productos de amplificación se detectaron tanto por electroforesis como por hibridación, en este último caso mediante el kit comercializado *Colorimetric Detection of Nucleic Acids* (*Symbiosis®*).

Adicionalmente, en 22 de las 46 muestras, se detectó ADN de *Legionella* mediante PCR en tiempo real siguiendo el protocolo diseñado para el *ProbeTec®* de la casa *Becton Dickinson®.*

Las características clínicas y epidemiológicas de los pacientes de los que se obtuvieron las muestras se reflejan en la **Tabla 6**. Todos ellos fueron atendidos en el Hospital Universitario Morales Meseguer durante los días en los que el brote epidémico de legionelosis permanecía activo, según los estudios epidemiológicos.

Los pacientes se dividieron en dos grandes grupos:

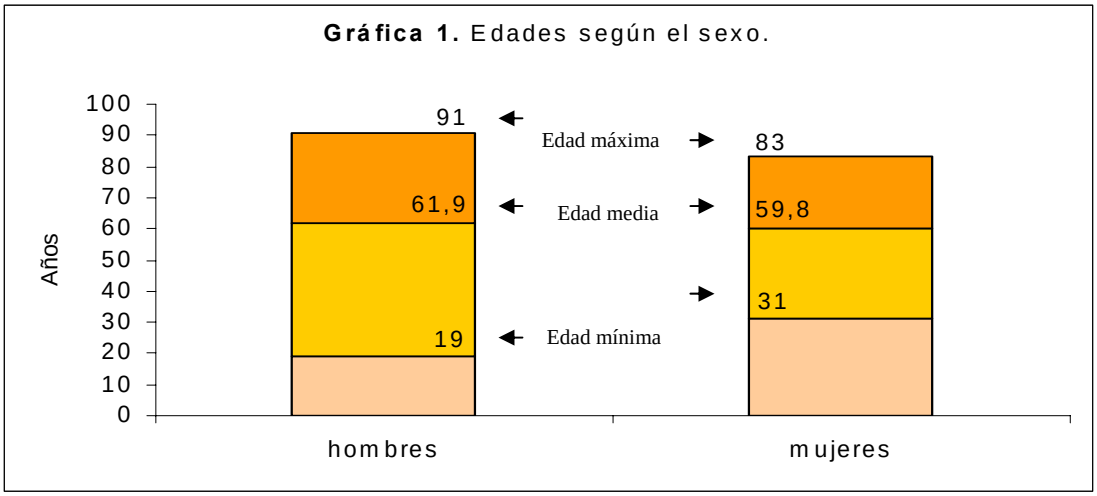
- GRUPO I: constituido por pacientes con sospecha clínica de legionelosis a los que se les pidieron pruebas microbiológicas para detectar la infección por *Legionella*. En función del resultado de estas pruebas se diferenciaron 2 subgrupos. El subgrupo IA incluye aquellos pacientes con diagnóstico positivos de legionelosis, es decir, en los que al menos una de las pruebas microbiológicas fue positiva, según los criterios establecidos por el CDC (www.cdc.gorv/epo/dphsi/print/legionellosis_current.htm; 22/septiembre/2003). El subgrupo IB incluye los pacientes con diagnóstico negativo de legionelosis, esto es, en los que todas las pruebas microbiológicas realizadas para el diagnóstico de la enfermedad fueron negativas.

- GRUPO II: formado por pacientes en los que no se encontró sospecha clínica de legionelosis y a los que, por tanto, no se les pidieron pruebas microbiológicas para la detección de *Legionella*.

grupo	pac	procedencia	edad	sexo	fum exfum	fiebre	dias tto muestra	tto	diag	otros
	1	Sta Mª Gracia	45	h	sí	sí	0	M	LD	VIH
	2	otros municipios	53	h	sí	sí	1	QR	LD	nd
	3	nd	80	h	no	nd	4	nd	LD	nd
	4	otros municipios	91	h	no	sí	0	M	LD	EPOC
	5	otros municipios	52	h	sí	sí	0	QR	LD	nd
	6	otros barrios	47	h	sí	sí	0	QR	LD	nd
	7	Zar-Sant	70	h	sí	sí	0	QMR	LD	EPOC
	8	Vistaalegre	48	h	sí	sí	1	QMR	LD	Diabetes nd
	9	Sta Mª Gracia	31	m	sí	sí	1	QR	LD	nd
	10	Murcia Centro	48	h	sí	sí	2	M	LD	EPOC
	11	Vistaalegre	65	h	sí	sí	4	QR	LD	EPOC
	12	Sta Mª Gracia	79	h	sí	sí	1	QMR	LD	nd
IA	13	Sta Mª Gracia	75	h	no	sí	1	QR	LD	nd
	14	Vistaalegre	59	h	sí	sí	1	Q	LD	EPOC
	15	Vistaalegre	81	h	si	no	7	M	LD	EPOC
	16*	Zar-Sant	54	h	sí	sí	6	QMR	LD	nd
	17	otros municipios	44	h	sí	sí	0	Q	LD	nd
	18	nd	77	h	no	nd	0	nd	LD	nd
	19	otros municipios	72	m	no	sí	3	Q	LD	nd
	20	Murcia Centro	70	h	si	sí	0	M	LD	nd
	21	Vistaalegre	43	h	si	sí	2	Q	LD	nd
	22	ronda norte	88	h	sí	sí	0	Q	LD	nd
	23	Vistaalegre	77	h	sí	sí	4	QM	LD	EPOC
	24	San Basilio	79	h	si	sí	0	Q	LD	EPOC
	25	Vistaalegre	22	h	sí	sí	0	Q	LD	nd
	26	Murcia Centro	46	h	no	sí	1	Q	LD	nd
	27	Vistaalegre	66	h	sí	sí	1	Q	nd	EPOC
	28	otros municipios	75	h	no	no	1	Q	NAC	Diabetes Esplenec-tomizado
	29	nd	77	h	no	nd	2	nd	nd	EPOC
IB	30	Sta Mª Gracia	83	h	sí	sí	3	MR	nd	EPOC
	31	nd	72	h	no	nd	1	nd	nd	nd
	32	nd	50	m	no	nd	0	nd	nd	Bronquitis crónica
	33	Murcia Centro	81	h	no	no	1	M	nd	Diabetes EPOC
	34	Vistaalegre	82	m	no	no	0	M	nd	EPOC
	35	nd	79	h	no	nd	Nd	nd	nd	nd
	36	nd	52	h	no	nd	Nd	nd	nd	nd
	37	otros municipios	41	m	no	sí	Nd	nd	nd	nd
	38	nd	54	h	no	nd	Nd	nd	nd	nd
	39	otros municipios	83	m	no	no	Nd	M	nd	IR
II	40	otros municipios	52	h	sí	sí	Nd	nd	Pm	EPOC
	41	otros barrios	44	h	sí	nd	Nd	nd	nd	Diabetes EPOC
	42	otros municipios	19	h	no	nd	Nd	nd	nd	Tuberculosis nd
	43	nd	67	h	no	nd	Nd	nd	nd	nd
	44	Murcia Centro	23	h	sí	nd	Nd	nd	p-hemop	nd
	45	nd	73	h	no	nd	Nd	nd	nd	nd

Tabla 6. Características clínicas y epidemiológicas de los pacientes estudiados. **pac**:pacientes; **fum/exfum**:fumador o exfumador; **días tto muestra**:días de tratamiento antimicrobiano hasta recogida de muestra; **tto**:tratamiento antibiótico recibido; **diag**:diagnóstico; **16***:paciente con 2 muestras; **nd**:no datos; **Zar-Sant**:Zarandorna-Santiago; **m**:mujer; **h**:hombre; **Q**:quinolonas; **M**:macrólidos; **R**:rifampicina; **LD**:enfermedad del legionario; **NAC**:neumonía adquirida en la comunidad; **Pm**:aislamiento de *Proteus mirabilis*; **p-hemop**:pseudo hemoptisis; **EPOC**:enfermedad pulmonar obstructiva crónica; **IR**:infección respiratoria.

De los 45 pacientes que conforman el grupo de estudio, 6 (13%) pertenecían al sexo femenino y 39 (87%) al masculino. En los varones (n=39) la edad media fue de 61.9 años, siendo el más joven de 19 y el más anciano de 91, mientras que en el grupo de mujeres (n=6) la media fue de 59.8 años y abarca un rango más estrecho que los hombres, de los 31 a los 83 años (**Gráfica 1**).



Geográficamente, los casos se distribuyen en 8 zonas, 7 de ellas pertenecientes a la ciudad de Murcia y 1 en la que se incluyen los casos recogidos en otros municipios (**Figura 10**). El número de casos registrados en cada zona se puede ver en la **Gráfica 2**.

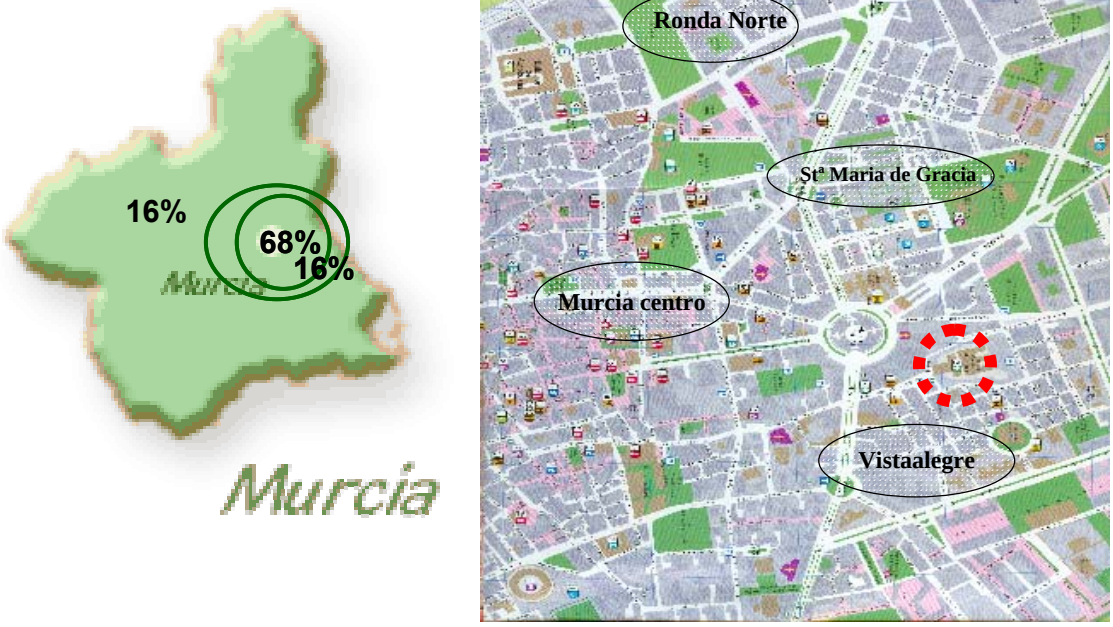
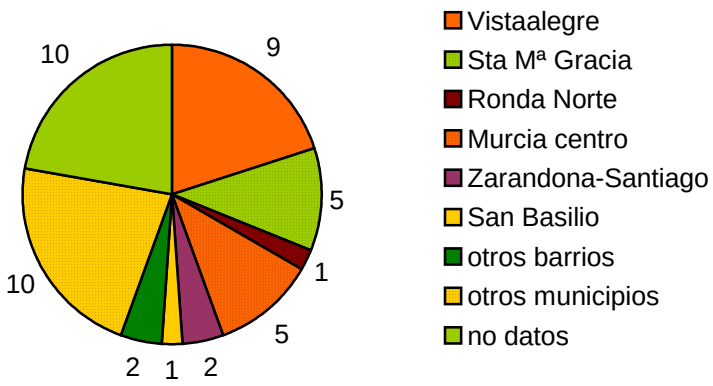


Figura 10. Distribución de los casos en la Región y en la Ciudad de Murcia. En el mapa de la ciudad se destacan los 4 barrios más próximos al origen del brote (señalado en rojo).

Gráfica 2. Número de casos por zona geográfica.

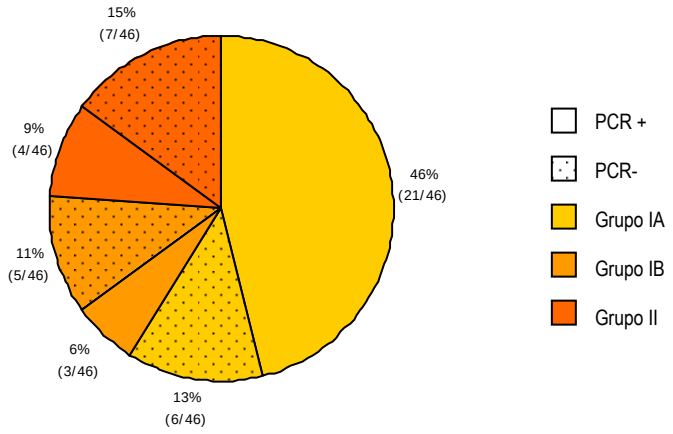


RESULTADOS DE LA PCR ORDINARIA

Mediante electroforesis convencional, se consideró resultado positivo la aparición de una única banda de 386 pares de bases y resultado negativo la ausencia de la misma. Con este criterio, se obtuvieron un total de 28 reacciones positivas (28/46, 61%) y 18 negativas (18/46, 39%).

En la **Gráfica 3** se muestran los resultados de la PCR según los grupos de estudio considerados (**Tabla 6**). En ella se refleja el número de reacciones (en tanto por ciento) respecto al total llevadas a cabo en cada grupo de pacientes y el resultado de las mismas, positivo o negativo. Junto a estas cifras aparece una fracción que indica, en valores absolutos, el mismo dato.

Gráfica 3. Resultados de PCR según el grupo de estudio.



Dentro del grupo I, un total de 26 pacientes y 27 muestras (subgrupo IA; **Tabla 7**) tuvo un diagnóstico positivo definitivo de infección por *Legionella* según los criterios definidos por el CDC. En este grupo de pacientes, la infección fue confirmada por: 1) cultivo, detección de antígeno en orina y seroconversión en un paciente, 2) seroconversión y detección de antígeno en 17 pacientes (18 muestras) y 3) únicamente seroconversión en 8 pacientes. De estas 27 muestras, la PCR fue positiva en 21 (77.7%). El mayor porcentaje de resultados positivos de PCR fue encontrado en el grupo de pacientes en los que el diagnóstico fue realizado tanto por seroconversión como por detección de antígeno en orina (16/18, 88.9%). Sólo en la mitad de pacientes con diagnóstico confirmado únicamente por serología (4/8, 50%) el resultado de la PCR fue positivo.

Grupo/subgrupo Pacientes	**cul**	**ag**	**ser**	**Muestras respiratorias** nº muestras	PCR +	PCR -
IA	+	+	+	1	1	0
	-	+	+	18	16	2
	-	-	+	8	4	4
IB	-	-	nd	5	2	3
	-	-	-	3	1	2
II	-	nd	nd	11	4	7

Tabla 7. Resultado de PCR de las muestras respiratorias según el grupo de pacientes y los resultados obtenidos por diagnóstico convencional. **cul**: cultivo; **ag**: antígeno urinario; **ser**: seroconversión; **nd**: no datos.

De los 8 pacientes (8 muestras) pertenecientes al grupo I con diagnóstico microbiológico de legionelosis negativo (subgrupo IB; **Tabla 7**), en 5 no se disponía de resultados de serología pero el antígeno de orina y cultivo fueron negativos y en 3 todas las pruebas microbiológicas, incluyendo diagnóstico serológico, fueron negativas. La PCR fue positiva en 3 de los 8 pacientes (37,5%).

Los resultados del VPP, VPN, S y E, de la técnica de PCR revelada por electroforesis, se han hallado tomando como referencia los resultados del test del antígeno en orina, la seroconversión, la coincidencia en el resultado de ambas pruebas diagnósticas y el diagnóstico microbiológico definitivo:

	Antígeno urinario		
	+	-	
PCR+	17	7	24
PCR -	2	9	11
	19	16	**35**

VPP: 70.8% **VPN:** 88% **S**: 89.5% **E**: 56.3%

	Seroconversión		
	+	-	
PCR+	21	1	22
PCR -	6	2	8
	27	3	**30**

VPP: 95% **VPN:** 25% **S**: 77.8% **E**: 66.7

	Antígeno urinario y Seroconversión		
	+	-	
PCR+	17	1	18
PCR -	2	2	4
	19	3	**22**

VPP: 94.4% **VPN:** 50% **S**: 89.5% **E**: 66.7%

	Legionelosis		
	+	-	
PCR+	21	3	24
PCR -	6	5	11
	27	8	**35**

VPP: 87.5% **VPN:** 45.5% **S**: 77.8% **E**: 66.7%

En el grupo II se incluyeron los pacientes sin sospecha clínica de legionelosis. Durante el brote, el Servicio de Microbiología estableció un protocolo por el que todas las muestras respiratorias que llegaban al laboratorio tenían que ser cultivadas en medios específicos para el aislamiento de *Legionella*. Puesto que se obtuvieron muestras respiratorias de los 11 pacientes del grupo II en ese tiempo, se cultivaron, aunque no se observó crecimiento en ningún caso. Sin embargo, al someter las muestras al test de PCR se obtuvieron 4 reacciones positivas y 7 negativas (**Tabla 7**).

Con el fin de tener un control sobre la técnica de PCR ordinaria empleada en este estudio, 8 alícuotas de las 46 muestras del estudio se mandaron a un laboratorio de referencia para el diagnóstico de legionelosis en muestras de esputo por una técnica similar. En la **Tabla 8** se reflejan los resultados de las pruebas características para el diagnóstico de legionelosis de los pacientes de los que proceden las muestras respiratorias enviadas al laboratorio de referencia. Además, se refleja el diagnóstico definitivo de legionelosis y el resultado de la PCR de nuestro estudio y del laboratorio de referencia. La concordancia total entre los resultados de la PCR del laboratorio de referencia y la PCR de nuestro estudio es de un 87.5%, con una única diferencia en una muestra, PCR+ en nuestro caso y PCR- en el del laboratorio de referencia, cuyo resultado definitivo según los criterios del CDC sería positivo para legionelosis.

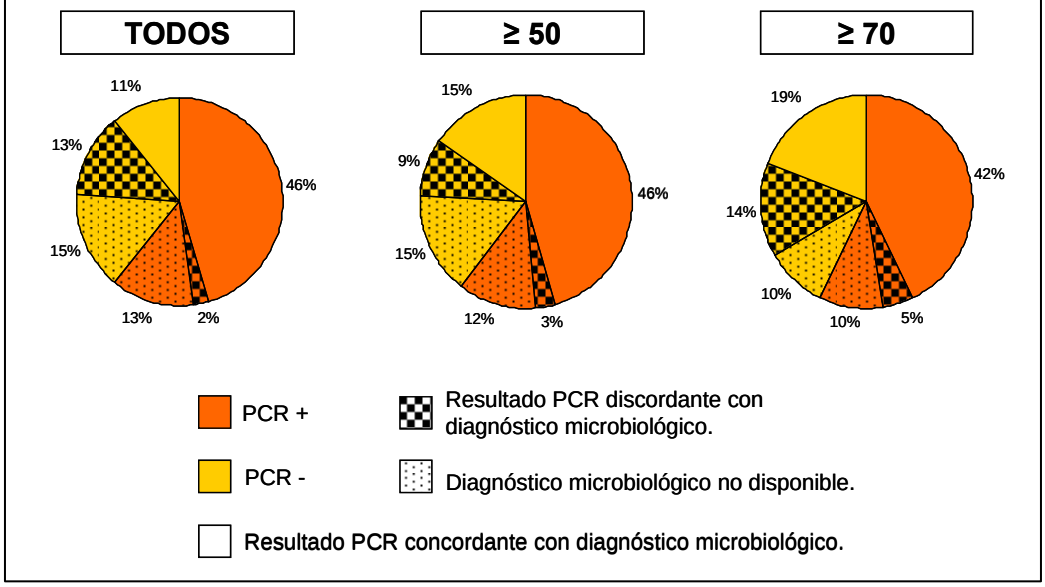
MUESTRA	CULTIVO	ANTÍGENO	SEROCONV.	LEGIONELOSIS	PCR estudio	PCR referencia
1	neg	Pos	pos	pos	pos	pos
2	neg	Pos	pos	pos	pos	pos
3	neg	pos	pos	pos	pos	pos
4	neg	pos	pos	pos	pos	pos
5	pos	pos	pos	pos	pos	pos
6	neg	neg	nd	neg	neg	neg
7	**neg**	**pos**	**pos**	**pos**	**pos**	**neg**
8	neg	pos	pos	pos	neg	neg

Tabla 8. Resultados de las pruebas características para el diagnóstico de legionelosis de los pacientes de los que proceden las muestras respiratorias enviadas al laboratorio de referencia. La fila sombreada resalta el único resultado discordante entre la PCR de nuestro estudio y la realizada en el laboratorio de referencia.

PCR Y EDAD DE LOS PACIENTES

Se estudió la relación entre el resultado de la PCR y la edad de los pacientes. Para ello se estudiaron los pacientes por grupos de edad (**Figura 11**): el grupo **TODOS** incluye todas las edades, por lo que contiene las 46 muestras respiratorias proporcionadas por los 45 pacientes; el grupo **≥50** incluye 33 muestras de los 32 pacientes ≥50 años; el grupo **≥70** incluye 21 muestras de los 21 pacientes ≥70 años. La similitud gráfica que muestran los tres grupos quedó estadísticamente respaldada por un test de Fiser (datos no mostrados) del que no se extraía ninguna relación entre la edad del paciente que proporcionaba la muestra y el resultado del test de PCR de esa muestra.

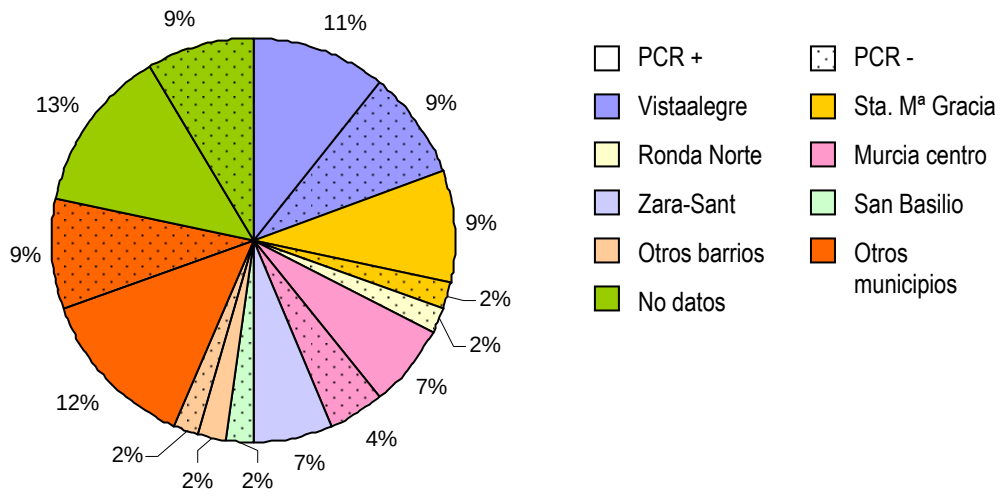
Figura 11. Resultados según grupos de edad.



PCR Y ZONA GEOGRÁFICA DE PROCEDENCIA

En la Gráfica 4 **se muestran los resultados de la PCR según la zona geográfica de procedencia de los pacientes. Con el fin de averiguar si existía alguna relación entre la presencia de ADN de** *Legionella* **en esputo y la proximidad de la residencia del paciente al foco origen del brote, se hizo un test de Fiser (datos no mostrados) agrupando, por un lado, los 4 barrios más cercanos al centro emisor (Vistaalegre, Ronda Norte, Sta. Mª de Gracia y Murcia Centro) y, por otro, el resto de zonas geográficas consideradas. El porcentaje de PCR positivas y negativas obtenidas en ambos grupos fue el mismo.**

Gráfica 4. Resultados de PCR según la zona geográfica de procedencia.



Como se ha comentado en la introducción, una de las características de las neumonías atípicas, como la legionelosis, es la dificultad para obtener una muestras respiratoria del paciente debido a que sólo el 50% de los pacientes presentan tos productiva (Maiwall, 1995). Por este motivo, en muchos casos el paciente había comenzado a recibir antibioterapia antes de recogerle la muestra respiratoria. Basándonos en esta circunstancia, se estudió, mediante un test de Fiser, el resultado de la PCR según el número de días de tratamiento antibiótico previos a la recogida de la muestra respiratoria (datos en **Tabla 9**). Para el análisis sólo se tuvieron en cuenta 35 muestras, aquellas de cuyos 34 pacientes (grupo I) se conocía si habían sido tratados o no con antibióticos. El resultado del análisis no indicó ninguna relación entre el resultado de la PCR y el número de días de tratamiento.

Días tratamiento	0	1	2	3	4	6	7
% PCR+ (nº muestras)	76.9% (1	60% (10)	50% (4)	50% (2)	66.7% (3)	100% (2)	100 (1)

Tabla 9. Número de muestras positivas por PCR según los días de tratamiento antimicrobiano previos a la recogida de la muestra.

Sin embargo, al hacer dos grupos con las muestras, uno con aquellas procedentes de los pacientes que habían recibido antibioterapia y otro con las de los pacientes que no la habían recibido, y someter de nuevo los datos a un test de Fiser, se encontró una cierta tendencia: el porcentaje de PCR+ en el grupo de las muestras que no habían recibido tratamiento antibiótico alcanzaba el 76.9%, mientras que el grupo de las que sí había recibido tratamiento llegaba al 63.6% (**Tabla 10**).

	PCR+	PCR-	total
Tratamiento antimicrobiano	**63.6%** (**14**)	28.6% (**8**)	100% (22)
No tratamiento antimicrobiano	**76.9%** (**12**)	23.1% (**3**)	100% (13)
total	79.4% (26)	20.6% (9)	100% (**35**)

Tabla 10. Relación entre el resultado del test de PCR y la toma de antibióticos. Test exacto de Fiser: p=0.210.

La detección del producto amplificado mediante **hibridación** se realizó empleando el kit comercializado *Colorimetric Detection of Nucleic Acids* (*Symbiosis*®). Los resultados de esta técnica, referidos al diagnóstico microbiológico definitivo se pueden ver a continuación:

	Legionelosis		
	+	-	
Hibridación +	11	3	14
Hibridación -	16	5	21
	27	8	**35**

VPP: 78.6% **VPN**:23.8% **S**: 40.7% **E**: 62.5%

RESULTADOS DE PCR EN TIEMPO REAL **(ProbeTec®; Becton Dickinson®)**

Por la técnica de PCR en tiempo real *ProbeTec®*, se procesaron 22 muestras respiratorias de las 46 sometidas a las pruebas anteriores. Se obtuvieron 8 resultados positivos y 14 negativos. Los valores del VPP, VPN, S y E revelados obtenidos por el *ProbeTec®* en relación con el diagnóstico definitivo de legionelosis fueron los siguientes:

	Legionelosis		
	+	**-**	
ProbeTec +	8	0	8
ProbeTec -	7	7	14
	15	7	**22**

VPP: 100% **VPN**: 50% **S**: 53.3% **E**: 100%

TABLA RESUMEN DE LOS RESULTADOS EN LAS MUESTRAS RESPIRATORIAS

	PCR/Ag	**PCR/Ser**	**PCR/Ag+Ser**	**PCR/Leg.**	**Hib./Leg.**	**ProbeTec/Leg.**
VPP (%)	70.8	**95.5**	**94.4**	**87.5**	76.9	**100**
VPN (%)	**81.8**	25	50	45.5	22.7	50

2. MUESTRAS DE ORINA

El ADN de las muestras de orina se procesó de igual forma que el de las muestras respiratorias. Mediante una técnica de PCR ordinaria y empleando el kit *Legionella DNA presence SBF39*, se amplificó un fragmento del gen que codifica para la molécula de ARNr 16S de *Legionella* spp. La detección de los productos de reacción se hizo por electroforesis, considerando resultado positivo la presencia de una única banda de 386 parares de bases y resultado negativo la ausencia de la misma.

Se procesaron un total de 25 muestras procedentes de 19 pacientes. De éstos, en 6 pacientes se obtuvieron 2 muestras separadas por un período de tiempo de al menos 24h. Del resto de pacientes (13) se estudió sólo una muestra.

La **Tabla 11** muestra el resultado de la PCR de las muestras de orina. En ella se reflejan los grupos de pacientes de los que proceden las muestras, así como los resultados de las pruebas características para el diagnóstico microbiológico de legionelosis de los pacientes de los que proceden las muestras de orina.

Subgrupo	LD	**Ag**	Ser	Nº muestras	**PCR+**	**PCR-**
IA	+	+	+	10	7	3
		-	+	10	4	6
IB	-	-	-	5	0	5
			total	**25**	**11**	**14**

Tabla 11. Resultado de la PCR en muestras de orina. Ag:antígeno en orina; ser:seroconversión; LD:legionelosis.

En los pacientes IA, de los 10 con diagnóstico positivo de legionelosis confirmado por antígeno y seroconversión, 7 dieron una PCR positiva y 3 negaiva. De otros tantos con diagnóstico confirmado por seroconversión pero antígeno de orina negativo, 4 fueron positivos para la reacción y 6 negativos. En el caso de los 5 pacientes con diagnóstico negativo para la enfermedad, grupo IB, todos dieron un resultado negativo en la detección de ADN.

El VPP, VPN, S y E de la PCR ordinaria en orinas se calculó respecto a los resultados de la detección del antígeno de urinario, del diagnóstico concordante del antígeno y la seroconversión y del diagnóstico definitivo de legionelosis:

	Antígeno en orina		
	+	-	
PCR +	7	4	11
PCR -	3	11	14
	10	15	**25**

VPP: 63.6% **VPN:** 78.6% **S**: 70% **E**:73.3%

	Antígeno en orina y seroconversión		
	+	-	
PCR +	7	0	7
PCR -	3	5	5
	10	5	**15**

VPP: 100% **VPN:** 62.5% **S**:70% **E**:100%

	Legionelosis		
	+	-	
PCR +	11	0	11
PCR -	9	5	14
	20	5	**25**

VPP: 100% **VPN:** 35.7% **S**: 55% **E**: 100%

Al igual que con las muestras respiratorias, se hizo, mediante un test de Fiser, un análisis de los resultados de la PCR ordinaria de las orinas en relación a la edad, la zona geográfica de procedencia y la toma previa de antibióticos, pero, a diferencia de las muestras respiratorias, no se halló ninguna relación en ninguno de los casos supuestos.

4

DISCUSIÓN

Actualmente, confirmar una legionelosis resulta especialmente complicado por las escasas estrategias diagnósticas disponibles, tanto clínicas como microbiológicas. Por un lado, la neumonía causada por *Legionella* no manifiesta una sintomatología ni muestra unos signos radiográficos característicos que la distingan de neumonías de otra etiología, y por otro, el diagnóstico de laboratorio se ve desfavorecido por las limitaciones que presentan las técnicas puestas en práctica habitualmente.

Como se ha comentado con anterioridad, el aislamiento de la bacteria en cultivo necesita varios días de incubación y tiene una sensibilidad variable (muy baja en nuestro caso). Al igual que el cultivo, las técnicas serológicas también cuentan con el problema de dar resultados lejanos en el tiempo. Un resultado positivo mediante inmunifluorescencia directa no se considera válido como único test para confirmar la enfermedad, y el test del antígeno urinario sólo detecta las infecciones causadas por el serogrupo 1 de *Legionella pneumophila*.

La prevalencia relativamente baja de la enfermedad del legionario demanda una técnica de detección altamente sensible y específica. La técnica de PCR es una herramienta atractiva para el diagnóstico de casos de neumonía porque, potencialmente, puede detectar cantidades del orden de fentogramos (Jonas, 1995) del ácido nucleico de cualquier patógeno neumónico, lo que en nuestro caso puede conducir a un diagnóstico más seguro y temprano de la enfermedad del legionario en pacientes con neumonía atípica (Harald, 1993).

Además, la técnica no depende de la viabilidad del microorganismo diana, probablemente se ve menos afectada por la aplicación de tratamientos antimicrobianos previos que los métodos basados en el cultivo y proporciona resultados más rápidamente. Por otro lado, tiene la ventaja potencial de ser una técnica más sensible al poder detectar, con los cebadores adecuados, cualquiera de las especies y serogrupos de *Legionella* que causen la infección (Murdoch, 2003).

Las muestras de agua ambiental fueron las primeras en las que se practicó la detección de ADN de *Legionella* spp. por PCR. A raíz de las deficiencias mostradas por los métodos disponibles para el diagnóstico de la legionelosis se consideró que la PCR podría abrir un nuevo campo en el diagnóstico microbiológico de la enfermedad.

Los trabajos publicados en los que se realiza una PCR ordinaria a muestras respiratorias, amplificando fragmentos del gen ARNr de 16S, reflejan unos resultados que apoyarían el empleo de

esta técnica como alternativa a las pruebas establecidas (Lisby, 1994; Jonas, 1995; Cloud, 2000; Uldum; 2002). Aunque los resultados aportados por estos autores sean útiles como referencia, todos se obtuvieron como resultado del análisis de muestras procedentes de casos esporádicos de legionelosis, contexto completamente distinto al que nos ocupa: un brote.

Con el fin de evaluar la amplificación de ADN como técnica para la detección de *Legionella* spp. en muestras de esputo, el ensayo se aplicó, en un estudio retrospectivo, a 46 muestras respiratorias obtenidas de pacientes atendidos durante el brote de legionelosis ocurrido en Murcia en julio de 2001 (García-Fulgueiras, 2003).

Si se analizan los resultados de la electroforesis por grupo de pacientes (ver Tabla 6), el grupo IA, constituido por 27 muestras procedentes de individuos con sospecha clínica y diagnóstico positivo de legionelosis, proporciona 21 reacciones positivas y 6 negativas. Entre estas 6 muestras negativas, 3 proceden de pacientes en los que se había instaurado un tratamiento antibiótico previo a la obtención de la muestra respiratoria, de 1, 2 y 4 días de duración en cada caso, aspecto que podría explicar el resultado negativo aunque se considere que la técnica de PCR puede verse menos afectada que otras pruebas por la instauración de antibióticos previa a la recogida de la muestra (Murdoch, 2003). Sin embargo, hay que tener en cuenta que los resultados obtenidos, tras realizar el test de Fiser, al relacionar el resultado de la PCR con la toma o no de antibioterapia previa a la recogida de la muestra, indican una tendencia a aumentar el número de PCR+ en aquellos pacientes que no han tomado antibióticos. En los tres casos restantes se sabe que los pacientes no habían recibido terapia antimicrobiana previa. En dos de ellos el diagnóstico de legionelosis sólo se confirmó por seroconversión y en el restante la enfermedad se confirmó tanto por seroconversión como por detección del antígeno en orina. Por tanto, los tres últimos resultados se consideran falsos negativos de la técnica.

El subgrupo IB consta de 8 pacientes con sospecha clínica de legionelosis en los que todas las pruebas microbiológicas dieron un resultado negativo o no hay datos de la seroconversión. En tres de ellos las pruebas fueron negativas para el cultivo, el antígeno urinario y la seroconversión. En dos, la PCR fue negativa confirmando los resultados ya obtenidos, pero en uno fue positiva. Atendiendo a la historia clínica de este paciente, se vio que la sintomatología y signos clínicos podían ser compatibles con los ofrecidos por una neumonía. El paciente era un varón de 77 años que padecía EPOC como enfermedad de base, mostró evidencias radiográficas de neumonía (infiltrado pulmonar), tos y disnea, y no había recibido terapia antimicrobiana antes de recoger la muestra respiratoria. Entre los 5 pacientes

sin datos de la seroconversión y con resultado negativo para el cultivo y el antígeno urinario, la PCR fue negativa en 3 ocasiones y positiva en 2. En uno de estos dos pacientes positivos para la PCR, la historia clínica describe una mujer de 82 años, residente en el barrio de Santa María de Gracia, con evidencia radiográfica de neumonía y que ingresó por fiebre. Además, en la analítica se observan niveles de sodio en el límite inferior (135mmol/l) y había sido tratada con antibióticos en los días previos a la recogida de la muestra. El otro paciente con resultado positivo para la PCR era también mujer, de 50 años, con bronquitis crónica de enfermedad de base, que ingresó con tos, disnea y otros síntomas inespecíficos. Se le diagnosticó una neumonía nosocomial de etiología desconocida. Los datos clínicos de los dos casos descritos no descartan la posibilidad de una legionelosis en estas dos pacientes puesto que presentan signos radiográficos y síntomas clínicos compatibles con una neumonía. Además, no sabe cuál habría sido el resultado de la seroconversión de haberse realizado ya que hay que tener en cuenta que esta fue la técnica más sensible de las empleadas durante el brote (de los 322 pacientes con diagnóstico microbiológico de legionelosis, el 90% tuvo seroconversión).

El grupo II está formado por 11 pacientes a los que no se les pidió un diagnóstico microbiológico de legionelosis. Sin embargo, durante el tiempo que duró el brote, todas las muestras respiratorias que llegaron al laboratorio se cultivaron en medio BCYE, siendo negativas estas 11. De ellas, 6 muestras dieron un resultado negativo por PCR, pero 4 fueron positivas. Sólo se disponía de la historia clínica de uno de los 4 pacientes: varón, de 23 años, residente en Murcia centro, fumador, con EPOC como enfermedad de base, que ingresó con fiebre.

Tras analizar el resultado de cada muestra de forma exhaustiva, hay que pasar a analizar las cifras obtenidas en el estudio estadístico. Según Silva (Silva, 1987), un buen resultado de valor predictivo ha de hallarse entre el 85-100%. Tomando este porcentaje como referencia, podríamos decir que el diagnóstico de legionelosis mediante PCR ordinaria de muestras respiratorias es un buen método para confirmar la enfermedad del legionario si se compara con el diagnóstico solamente por serología (95.5%), por detección del antígeno urinario y serología conjuntamente (94.4%), o por diagnóstico microbiológico definitivo de legionelosis (87.5%). Sin embargo, las cifras obtenidas para el VPN (25%, 50% y 45.5%, respectivamente) no valoran positivamente la técnica como método para descartar la enfermedad. Al contrario que en estos casos, el VPP (70.8%) de la PCR respecto a la detección del antígeno en orina no alcanza cifras tan altas, algo que sí hace el VPN, llegando al 81.8%. Este cambio en el VPN, probablemente esté relacionado con la disminución en la sensibilidad que sufre la el test del antígeno urinario en el contexto de un brote (Yzerman, 2002).

El método de extracción de ADN empleado en este trabajo para las muestras respiratorias se ha visto envuelto en un problema de contaminación de la columna de extracción con ADN de *Legionella* spp. y LLAP (van der Zee, 2002; Evans, 2003). Puesto que la publicación de estos datos fue posterior a la realización de la extracción, no se hizo un chequeo de contaminación, como se recomienda, de los kits empleados. Sin embargo, los resultados de las 8 muestras enviadas al laboratorio de referencia apoyan la validez de nuestros datos. La concordancia de los resultados por ambas técnicas es del 87.5%. El único resultado discordante es un muy probable falso negativo del laboratorio de referencia. El paciente al que pertenecía la muestra respiratoria fue positivo para nuestra reacción de PCR y diagnosticado positivamente de legionelosis por detección del antígeno en orina y por seroconversión.

En 2002, Yzerman publicó un trabajo sobre la sensibilidad de los test de la detección del antígeno en orina tras estudiar las orinas proporcionadas por los pacientes del brote de legionelosis ocurrido en Holanda en 1999. En él, concluye que existe una relación entre la gravedad de la neumonía y la sensibilidad de este tipo de pruebas diagnósticas. Los mejores resultados de sensibilidad los hallaron con el test *Binax Now* sobre muestras de orina concentrada de modo que, en los pacientes con una neumonía leve la sensibilidad alcanzaba el 52%, con una neumonía moderada el 88% y con una neumonía grave el 100%. La sensibilidad del 47% para el mismo test obtenida en el brote de Murcia concuerda con la propuesta hecha por Yzerman puesto que, en el contexto de un brote, la alarma social hace que haya un volumen excesivo de personas que acuden a los centros sanitarios con sintomatología leve que, en otras circunstancias, no acudirían. Los resultados de sensibilidad aportados por Yzerman apoyan el uso de una técnica diagnóstica alternativa como la detección de ADN por PCR para el diagnóstico de la legionelosis, al menos, en el contexto de un brote. La contrapartida de poner en práctica esta técnica radica en la dificultad para obtener una muestra respiratoria, puesto que sólo la mitad de los pacientes con neumonía atípica la proporcionarían (Maywald, 1995). En cualquier caso, dicha circunstancia no hace memos meritoria esta técnica respecto al cultivo, considerado el "gold standard", puesto que ambas se sirven del mismo tipo de muestras.

Una forma de resolver el problema de la obtención de la muestra respiratoria es considerar otro tipo de muestras biológicas para el análisis: la orina. Hasta ahora, los trabajos publicados sobre la detección de ADN de *Legionella* en muestras de orina han utilizado el gen del ARNr 5S como diana, mostrando sensibilidades del 82% (Maiwald, 1995), 73% (Murdoch, 1996) y 72.4% (Helbig, 1999). En nuestro caso, el VPP de la PCR en muestras de orina detectando el gen del ARNr 16S ha alcanzado un 63.3% respecto al diagnóstico por detección del antígeno en orina y un 100% respecto al diagnóstico coincidente del antígeno y la serología y del microbiológico de legionelosis. Sin embargo, el VPN ha

mostrado un perfil similar al de las muestras respiratorias: la cifra más alta la reflejaba el análisis con el test del antígeno urinario (78.6%).

Teniendo en cuenta que la sensibilidad mostrada por el test de detección de antígeno en orina en el brote fue del 47% y que la técnica aplicada de PCR tiene la capacidad potencial de detectar todos los serogrupos y especies de *Legionella*, sería interesante hacer más estudios en esta línea con el fin de valorar la validez de las orinas como muestras clínicas útiles en el diagnóstico de la enfermedad del legionario.

Si se reduce el estudio a comparar el resultado de la PCR con el diagnóstico microbiológico definitivo de legionelosis, vemos que el VPP obtenido en las muestras respiratorias, 87.5%, no alcanza al de las muestras de orina, 100%, lo que apoyaría el uso de éstas últimas en detrimento de las primeras. Por otro lado, habría que destacar que el proceso de extracción de ADN a partir de muestras de orina es mucho más corto que el de muestras respiratorias, además de no haber encontrado una relación entre la toma de antibióticos y el resultado de la PCR. Estas ventajas, unidas a los valores de sensibilidad publicados por los autores referidos en el párrafo anterior sí apoyaría el uso de muestras de orina para realizar un diagnóstico de legionelosis por técnicas de detección de ADN.

No sabemos explicar, salvo alegar problemas en la técnica, la causa de obtener valores predictivos más bajos en el revelado de la PCR por hibridación (VPP=87.5; VPN=45.5) que por electroforesis (VPP=76.9; VPN=22.7) respecto al diagnóstico microbiológico definitivo, puesto que en la bibliografía consultada los datos apuntan siempre valores de hibridación iguales o mayores a la electroforesis.

Aunque el VPP del 100% aportados por el ProbeTec indica que es una técnica útil en la confirmación de la enfermedad, mostró la sensibilidad más baja de todas las técnicas aplicadas (53.3%, datos no mostrados). Probablemente esto se deba a la utilización de un método inadecuado en la extracción del ADN a partir de las muestras respiratorias (ver *Material y Métodos*). En el momento de trasvasar la muestra a las columnas que contienen el filtro, en muchas ocasiones se observaba una muestra excesivamente mucosa que incluso podía no ser capaz de atravesar el filtro tras sucesivas centrifugaciones. Esto indica que, con bastante probabilidad, la etapa de solubilización de la muestra y posterior tratamiento con proteinasa K fueron insuficientes. Una forma de comprobar esta explicación fue someter, a la técnica del ProbeTec, 4 muestras de ADN extraído mediante el protocolo descrito para la PCR ordinaria: se obtuvieron resultados concordantes con la electroforesis (datos no mostrados).

Una de las ventajas que se resaltaban en la introducción de la técnica de PCR sobre la detección del antígeno en orina, es la capacidad potencial de detectar cualquier especie y serogrupo de *Legionella* por PCR frente a la limitación de detectar únicamente *L. pneumophila* serogrupo 1 con el test inmunocromatográfico. Sin embargo, lo que es una ventaja *a priori* puede ocasionar imprevistos falsos positivos con relativa facilidad si no se hacen los controles adecuados durante el desarrollo de la parte experimental. *Legionella* es ubicua en el medio acuático y contamina fácilmente, no sólo preparados compuestos en su mayoría por agua como pueden ser los tampones, sino material que haya estado en contacto con el agua durante su fabricación, problema ya ha descrito en kits comercializados para la extracción de ADN a partir de muestras biológicas (van der Zee, 2002; Evans, 2003)

5

CONCLUSIONES

- ✓ La detección de ADN de *Legionella* por PCR ordinaria en muestras de esputo es un método rápido y sensible y podría ser considerado una alternativa a la detección del antígeno en orina para el diagnóstico de legionelosis, especialmente en situaciones epidémicas en las que está demostrado la baja sensibilidad de esta técnica.

- ✓ El VPP obtenido en la PCR ordinaria de las muestras de esputo permite considerar esta técnica adecuada para confirmar la enfermedad del legionario, pero el bajo valor del VPN indica que no es una técnica adecuada para descartar la enfermedad.

- ✓ La detección de ADN de *Legionella* en 4 pacientes sin sospecha clínica de legionelosis (grupo II) permitió en un caso el diagnóstico probable de esta enfermedad. El resto fueron considerados falsos positivos aún teniendo en cuenta la posibilidad de colonización por este microorganismo en estos paciente procedentes de zonas geográficas de riesgo.

- ✓ La PCR a tiempo real en muestras respiratorias, aún presentado la ventaja de la rápidez, mostró una sensibilidad más baja que la PCR ordinaria.

- ✓ La sensibilidad de la PCR en orina fue similar a la de la detección del antígeno urinario, presentado la ventaja añadida de la posibilidad de detectar todas las especies y serogrupos de la *Legionella* y no sólo el serogrupo 1 de *Legionella pneumophila*.

- ✓ El VPP obtenido permite considerar esta técnica adecuada para confirmar la enfermedad, pero el bajo VPN no la hace adecuada para descartarla.

6

BIBLIOGRAFÍA

Blackmon JA. *et al***.** Legionellosis. American Journal of Pathology 1981; 103:427-465.

Brenner DJ, Steigerwalt AG, McDade JE. Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, *genus novum, species nova*, of the family *Legionellaceae*, *familia nova*.Annals of International Medicine 1979; 90(4):656-8

Cloud JL, Carroll KC, Pixton P, Erali M, Hillyard DR. Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. Journal of Clinical Microbiology 2000;38(5):1709-12.

Dennis PJ, Lee JV. Differences in aerosol survival between pathogenic and non-pathogenic strains of *Legionella pneumophila* serogroup 1. Journal of Applied Bacteriology 1988; 65(2):135-41.

Edelstein PH. Antimicrobial chemotherapy for legionnaires' disease: a review. Clinical Infection Disseases 1995; 21(3):S265-76.

Evans GE, Murdoch DR, Anderson TP, Potter HC, George PM, Chambers ST. Contamination of Qiagen DNA extraction kits with *Legionella* DNA. Journal of Clinical Microbiology 2003; 41(7):3452-3.

Fernandez JA, Lopez P, Orozco D, Merino J. Clinical study of an outbreak of Legionnaire's disease in Alcoy, Southeastern Spain.European Journal of Clinical Microbiology and Infection Diseases 2002; 21(10):729-35.

Ferrer A, Bellver P, Falco V, Royo P. Screening quality of respiratory samples and *Legionella pneumoniae*. Journal of Clinical Microbiology 1995; 33(7):1971. Erratum in: Journal of Clinical Microbiology 1995; 33(11):3082.

Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clinical Microbiology Reviews 2002; 15(3):506-26.

Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, Parkin WE, Beecham HJ, Sharrar RG, Harris J, Mallison GF, Martin SM, McDade JE, Shepard CC, Brachman PS. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. New England Journal of Medicine 1977; 297(22):1189-97.

Garcia-Fulgueiras A, Navarro C, Fenoll D, Garcia J, Gonzales-Diego P, Jimenez-Bunuelas T, Rodriguez M, Lopez R, Pacheco F, Ruiz J, Segovia M, Balandron B, Pelaz C. Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain. Emerging Infectious Diseases. 2003; 9(8):915-21.

Helbig JH, Engelstadter T, Maiwald M, Uldum SA, Witzleb W, Luck PC. Diagnostic relevance of the detection of *Legionella* DNA in urine samples by the polymerase chain reaction. European Journal of Clinical Microbiology and Infection Diseases 1999; 18(10):716-22.

http://getentry.ddbj.nig.ac.jp/cgi-bin/get_entry2.pl?database=ddbj&query=af129524 (11/09/03)

http://www.cdc.gorv/epo/dphsi/print/legionellosis_current.htm (22/09/2003)

http://www.kcl.ac.uk/kis/schools/life_sciences/life_sci/legionella.gif;

http://www.ulb.ac.be/sciences/biodic/images/bacterie/3bactrie.jpg;

http://www.pref.aichi.jp/eiseiken/67f/microbiol6.html

Ingram JG, Plouffe JF. Danger of sputum purulence screens in culture of *Legionella* species. Journal of Clinical Microbiology 1994; 32(1):209-10.

Jantzen E, Sonesson A, Tangen T, Eng J. Hydroxy-fatty acid profiles of *Legionella* species: diagnostic usefulness assessed by principal component analisis. Journal of Clinical Microbiology 1993; 31:1413-1419.

Jonas D, Rosenbaum A, Weyrich S, Bhakdi S. Enzyme-linked immunoassay for detection of PCR-amplified DNA of *legionellae* in bronchoalveolar fluid. Journal of Clinical Microbiology 1995; 33(5):1247-52.

Lambert MA, Moss CW. Cellular fatty acid composition and isoprenoid quinone contents of 23 *Legionella* species. Journal of Clinical Microbiology 1989; 27:465-473.

Lisby G, Dessau R. Construction of a DNA amplification assay for detection of *Legionella* species in clinical samples. European Journal of Clinical Microbiology and Infection Diseases 1994; 13(3):225-31.

Maiwald M, Schill M, Stockinger C, Helbig JH, Luck PC, Witzleb W, Sonntag HG. Detection of *Legionella* DNA in human and guinea pig urine samples by the polymerase chain reaction. European Journal of Clinical Microbiology Infection Diseases 1995; 14(1):25-33.

Mellado A. Géneros Brucella, Legionella y Pasteurella. En: Microbiología Médica 1998; 271-276.

Meyer RD, Finegold SM. Legionnaires´ disease. Annual Review of Medicine 1980; 31:219-232.

Murdoch DR. Nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pneumonia. Clinical of Infection Diseases 2003; 36(9):1162-70.

Murdoch DR. Diagnosis of *Legionella* infection. Clinical of Infection Diseases 2003; 36(1):64-9.

Murray PR, Washington JA. Microscopic and baceriologic analysis of expectorated sputum. Mayo Clinical Procedures 1975; 50(6):339-44

Salleras Sanmartí, L. La legionelosis: un problema de salud pública emergente. Medicina clínica 2002; 119(2):1-3

Sabriá Leal, M. Legionelosis: pasado, presente y futuro. Medicina clínica 2002; 119(2):4-8

Prats Pastor G, Domínguez García A. *Legionella*: el microorganismo. Medicina clínica 2002; 119(2):9-13

Vaqué Rafart, J. Epidemiología de la legionelosis. Medicina clínica 2002; 119(2):14-24

Fernández N, Gudiol F, Domínguez J, Ausina Ruiz V,Sopena N. Legionelosis: clínica, diagnóstico y tratamiento. Medicina clínica 2002; 119(2):29-32

Saravolatz LD, Russell G, Cvitkovich D. Direct immunofluorescence in the diagnosis of Legionnaires' disease. Chest 1981; 79(5):566-70.

Silva LC. Métodos estadísticos para la investigación epidemiológica. Seminario Internacional de Estadística de Euskadi. 1987.

Sopena N, Sabria M, Pedro-Botet ML, Reynaga E, Garcia-Nunez M, Dominguez J, Matas L. Factors related to persistence of Legionella urinary antigen excretion in patients with legionnaires' disease. European Journal of Clinical Microbiology and Infection Diseases 2002; 21(12):845-8.

Swanson MS, Hammer BK. *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. Annual Review of Microbiology 2000; 54:567-613.

van der Zee A, Peeters M, de Jong C, Verbakel H, Crielaard JW, Claas EC, Templeton KE. Qiagen DNA extraction kits for sample preparation for legionella PCR are not suitable for diagnostic purposes. Journal of Clinical Microbiology 2002; 40(3):1126.

Vickers RM, Yu VL, Hanna SS, Muraca P, Diven W, Carmen N, Taylor FB. Determinants of *Legionella pneumophila* contamination of water distribution systems: 15-hospital prospective study. Infection and Control 1987; 8(9):357-63.

Yu VL, Feng-Yee C. Infección por Legionella. En: Principios de Medicina Interna 2001; 1117-1122.

Yu VL. *Legionella pneumophila* (Legionnaires´ disease). En: Principles and Practice of Infetious Disease 1990; 1764-1774.

Yu VL, Zuravleff JJ, Gavlik L, Magnussen MH. Lack of evidence for person-to-person transmission of Legionnaires' disease. Journal of Infection Diseases 1983; 147(2):362.

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. Journal of Clinical Microbiology 2002; 40(9):3232-6.

Zuravleff JJ, Yu VL, Shonnard JW, Davis BK, Rihs JD. Diagnosis of Legionnaires' disease. An update of laboratory methods with new emphasis on isolation by culture. JAMA 1983; 250(15):1981-5.

INDICE DE FIGURAS, TABLAS, GRÁFICAS

FIGURAS

Figura 1 3
Figura 2 4
Figura 3 6
Figura 4 7
Figura 5 9
Figura 6 19
Figura 7 20
Figura 8 21
Figura 9 28
Figura 10 38
Figura 11 42

TABLAS

Tabla 1 5
Tabla 2 11
Tabla 3 12
Tabla 4 15
Tabla 5 28
Tabla 6 37
Tabla 7 40
Tabla 8 42
Tabla 9 44
Tabla 10 44
Tabla 11 46

GRÁFICAS

Gráfica 1 38
Gráfica 2 39
Gráfica 3 39
Gráfica 4 43