



**INEI**  
Instituto Nacional de  
Enfermedades Infecciosas  
"Dr. Carlos G. Malbrán"



**ANLIS  
MALBRÁN**  
ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE LABORATORIOS  
E INSTITUTOS DE SALUD "DR. CARLOS G. MALBRÁN"

# Legionelosis

## Manual de procedimientos para el diagnóstico microbiológico

Edición 2021

**Prieto M, Cipolla L, Rocca F, Armitano R**  
**Servicio Bacteriología Especial,**  
**Departamento de Bacteriología**  
**INEI-ANLIS Malbrán**

2021

Prieto M, Cipolla L, Rocca F, Armitano R. Legionelosis Manual de procedimientos para el diagnóstico microbiológico. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, ANLIS Dr. C. G. Malbrán, 2021.(ANLIS/INEI/MP-L-ARG;2021) Disponible en:

<http://sgc.anlis.gob.ar/handle/123456789/2392>

**“Este recurso es el resultado del financiamiento otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto queda sujeto al cumplimiento de la Ley N° 26.899 y la política de gestión del conocimiento de la ANLIS”.**



**[Este obra está bajo una Licencia Creative Commons Attribution 4.0 International \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)**

# **Legionelosis**

## **Manual de procedimientos para el diagnóstico microbiológico**

**Bs. As, Argentina,  
2021**

## TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO	4
1. INTRODUCCIÓN	5
2. AGENTE ETIOLÓGICO	5
3. RESERVORIO	5
4. TRANSMISIÓN	6
5. CARACTERÍSTICAS CLINICAS	6
6. GRUPOS DE RIESGO	6
7. TRATAMIENTO	7
8. EPIDEMIOLOGIA	7
9. DEFINICIÓN DE CASO	7
10. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO	8
10.1. ANTIGENO URINARIO	9
10.2. CULTIVO	9
10.3. PRUEBAS SEROLÓGICAS	16
10.4. DETECCIÓN DE ADN-PCR	17
10.5. PROTOCOLO PCR CONVENCIONAL GEN <i>mip</i> y 16SrARN	19
10.6. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD	20
11. SUBTIPIFICACIÓN (PFGE)	21
12. PREGUNTAS FRECUENTES	23
BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA	25

## 1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad del legionario fue descrita en 1976 después de un importante brote de neumonía grave entre los asistentes a una convención de la Legión Americana en Filadelfia, Pensilvania. En 1977, el Centro para el Control de Enfermedades (CDC) en Atlanta, EE. UU, aisló el agente etiológico responsable del brote y en 1979 fue identificado como un bacilo gram negativo fastidioso que se clasificó como un nuevo género y se denominó *Legionella pneumophila*. El término genérico "legionelosis" se utiliza para describir estas infecciones bacterianas, que pueden variar en severidad desde una enfermedad leve, febril (Fiebre de Pontiac) a una neumonía de rápida evolución y potencialmente mortal (enfermedad del legionario). Resulta epidemiológicamente útil, agrupar los casos por la forma en que fueron adquiridos, como casos asociados a la comunidad, intrahospitalarios o asociados a viajes.

## 2. AGENTE ETIOLÓGICO

El género *Legionella* está constituido por bacilos gram-negativos, no formadores de esporas, no encapsulados. Pueden presentar formas filamentosas después de cultivo *in vitro*. El género *Legionella* está compuesto hasta el momento por más de 60 especies de las cuales más del 50% están asociadas a enfermedad humana, pero desde el punto de vista clínico las especies más importantes son: *L. pneumophila*, *L. micdadei*, *L. longbeachae*, y *L. dumofii*. *L. pneumophila* es el agente involucrado en más del 90% de los casos de legionelosis.

## 3. RESERVORIO

El principal reservorio de *Legionella* spp. es el agua y los ambientes hídricos, principalmente las fuentes artificiales de aguas templadas, como sistemas de plomería, termotanques, humidificadores, spas y torres de refrigeración. *Legionella* es una bacteria termotolerante, capaz de multiplicarse entre los 20 y 45 °C; puede sobrevivir entre los 40 y 60 °C, inactivándose por encima de los 70 °C.

#### 4. TRANSMISIÓN

*Legionella* ingresa al organismo por inhalación de aerosoles con gotas de agua contaminada, pero también puede ser adquirida a través de micro-aspiración de aguas contaminadas. La transmisión de persona a persona no se ha demostrado, ni se ha documentado la existencia de reservorios animales. Las fuentes más asociadas a infección son: sistemas de enfriamiento con torres de refrigeración, duchas, spa, piscinas, fuentes decorativas, cañerías expuestas, equipo de terapia respiratoria. **Existe una FALSA asociación de los aires acondicionados domésticos con legionelosis (los aires acondicionados domésticos no utilizan agua como enfriador).** Raramente, se puede adquirir legionelosis por inhalación de partículas de compost.

#### 5. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

El período de incubación es generalmente entre 2-14 días, con un promedio de 5-6 días. El inicio de la neumonía es leve, similar a episodios neumónicos causados por otros organismos. A menudo, en las etapas tempranas de la enfermedad solo se observan síntomas que incluyen fiebre, rigores y mialgias. En el transcurso de la enfermedad aparece una tos no productiva, que sigue por un periodo de 4 a 6 días más, y que cursa con pequeñas cantidades de esputo purulento situación que puede intensificarse si la enfermedad progresa rápidamente. Algunas veces pueden aparecer síntomas no respiratorios tales como náuseas, vómitos, diarrea y delirio. Las imágenes radiográficas muestran zonas irregulares o focales de consolidación, que pueden evolucionar a la afectación bilateral y a la insuficiencia respiratoria. La tasa de mortalidad es del 15-25%.

#### 6. GRUPO DE RIESGO

Los grupos de mayor riesgo incluyen: trasplantados, personas de más de 50 años de edad, tabaquistas, inmunosuprimidos, SIDA e individuos con enfermedades crónicas

como diabetes, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad renal crónica.

## 7. TRATAMIENTO

Los agentes antimicrobianos con buena actividad intracelular utilizados para el tratamiento de legionelosis son los macrólidos, tetraciclinas, y las fluoroquinolonas. Actualmente, la utilización de azitromicina y levofloxacina está respaldada por varios estudios observacionales recientes. La duración de la terapia antibiótica es de 7-10 días para aquellos individuos que responden positivamente y se recomienda 21 días para pacientes con severa inmunosupresión.

## 8. EPIDEMIOLOGÍA

La legionelosis puede afectar tanto a individuos en la comunidad como en el ambiente nosocomial y en ambos entornos puede ocurrir en forma de casos esporádicos o brotes epidémicos. La definición epidemiológica de caso utilizada por el CDC para la vigilancia de la legionelosis fue modificada en el año 2020 e incluye criterios clínicos, de laboratorio y epidemiológicos.

## 9. DEFINICIÓN DE CASO

*Criterio clínico:* Individuo con neumonía

*Criterio de Laboratorio para confirmación de un caso:* Se debe obtener al menos uno de los siguientes resultados:

- Aislamiento de *Legionella* spp. de secreciones respiratorias o cualquier otro sitio normalmente estéril
- Detección de antígeno de *L. pneumophila* en orina
- Seroconversión: aumento del título de anticuerpos en 4 veces o más, en sueros tomados en la fase aguda y convaleciente de la enfermedad, siempre que el título de la segunda muestra sea  $\geq 128$ , frente a *L. pneumophila* serogrupo 1, por inmunofluorescencia indirecta.

*Criterios de laboratorio para designar un caso como probable:* Se debe obtener al menos uno de los siguientes resultados:

- Detección de ácidos nucleicos de *Legionella* spp en muestras clínicas
- Detección de elevado título de anticuerpos (>1/256) para *L. pneumophila* serogrupo 1 u otros serogrupos

## 10. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Las características clínicas de la infección por *Legionella* pueden ser indistinguibles de las de otros agentes patógenos de neumonía adquirida en la comunidad y nosocomial, por lo tanto, los métodos de diagnóstico precisos son esenciales para proporcionar una terapia dirigida y oportuna. Para instaurar tratamiento antibiótico adecuado es suficiente confirmar la infección por *Legionella* sp. Sin embargo, la identificación de especie, serogrupo y subtipo es indispensable cuando ocurren aglomerados de casos y se investiga la exposición a una fuente común. No existe ninguna prueba disponible actualmente que permita la detección de todas las especies de *Legionella* asociadas a infección humana con un alto grado de sensibilidad y especificidad. Por lo tanto, se recomienda el examen de diferentes tipos de muestras con varias pruebas en paralelo. Es importante considerar legionelosis en el diagnóstico diferencial de cuadros de neumonías severas, principalmente en los pacientes ingresados a unidad de cuidados intensivos, aquellos con una neumonía que no responde a la terapia con antibióticos beta-lactámicos, y pacientes con factores de riesgo específicos, por ejemplo, viajes recientes: dentro de los 10 días posteriores al inicio de los síntomas, ciertas ocupaciones en las que puede haber ocurrido exposición a *Legionella*, reparación reciente de sistemas de plomería, inmunosupresión y enfermedad subyacente grave. El diagnóstico diferencial incluye: Neumonía atípica (virus, *Chlamydia* spp, *Mycoplasma*), NAC típica, NAC severa, Fiebre Q.

***La manipulación de muestras y aislamientos son prácticas que requieren condiciones de bioseguridad nivel 2. Las prácticas que involucren la creación de grandes volúmenes de aerosoles, requieren un nivel 3 de bioseguridad.***



## Métodos para diagnóstico de legionelosis

Método	Sensibilidad	Especificidad
Cultivo	20-80%	100%
Antígeno urinario	70-100%	95-100%
Seroconversión	80-90%	99%
PCR validada	-99%	>99%

### 10.1 DETECCIÓN DE ANTÍGENO URINARIO

Existen varios métodos inmunológicos comerciales para la detección de antigenuria. El anticuerpo de captura utilizado en estos ensayos es específico para *L. pneumophila* serogrupo 1, responsable de la mayoría de los casos humanos de legionelosis. Es detectable desde el inicio de la sintomatología de la infección y en algunos pocos casos hasta muchos meses después, sin verse influidos los resultados por la administración de antibióticos. Sin embargo, en la mayoría de los casos, el antígeno ya no es detectado en la orina después de 1 a 2 meses de iniciado el tratamiento.

La muestra de orina debe ser recolectada en un contenedor estéril, sin el agregado de preservantes. Se requiere un volumen mínimo de 5 ml. La muestra debe ser transportada al laboratorio inmediatamente a temperatura ambiente. En casos de demora del envío, la muestra debe ser refrigerada pero nunca congelada, ya que el congelamiento-descongelamiento puede afectar la sensibilidad y especificidad de la técnica.

Los métodos comerciales disponibles son el enzimoimmunoanálisis y la inmunocromatografía, con una especificidad para *L. pneumophila* serogrupo 1 entre 95-100% y una sensibilidad entre el 70-90%.

Los resultados falsos positivos representan un porcentaje bajo y pueden deberse al congelamiento-descongelamiento de la muestra o a la presencia de excesivo sedimento urinario. Ante la sospecha de resultados falsos positivos es recomendable que todas las muestras de orina positivas sean nuevamente analizadas después de hervir durante 5 min y centrifugar (5 min a 12.000 × g), y solo se deben considerar válidos los sobrenadantes que permanecen positivos.

## 10.2 CULTIVO

El rendimiento del método de cultivo varía según el inóculo de *Legionella*, el nivel de contaminación de las muestras, el tipo de muestras, el uso previo de antibióticos y la experiencia de los miembros del laboratorio. La especificidad es del 100% ya que *Legionella* no coloniza al humano y no ha sido nunca aislada en personas sanas. Dado

que a menudo se produce una co-infección con otros patógenos, el aislamiento de otros patógenos no excluye la posibilidad de una infección concomitante por *Legionella*.

### **Tipo de especímenes clínicos para cultivo o detección de ADN de *Legionella* spp.**

Los esputos son muestras aceptables para la investigación de *Legionella* si no se pueden realizar otros tipos de muestras. Sin embargo, 25-78% de los pacientes con neumonía por *Legionella* tienen tos no productiva que requiere, si el paciente lo permite, utilizar un método invasivo para obtener una muestra clínica. El aspirado traqueal es una muy buena muestra para la investigación de *Legionella*. El lavado broncoalveolar, cuando es posible realizarlo, también da muy buenos resultados. En el cuadro 1 se detallan las muestras aceptables para cultivo y/o PCR.

### **Transporte de la muestra**

Transportar los especímenes en recipientes estériles. Agregar un pequeño volumen de agua destilada estéril, no bacteriostática, si es necesario, para evitar la desecación. *L. pneumophila* es estable en muestras clínicas almacenadas a 4 ° C. Por lo tanto, las muestras que se pueden cultivar inmediatamente deben refrigerarse (4 ° C), y si el retraso excede 3-5 días, deben congelarse (preferiblemente a -80 ° C). Debe evitarse la congelación y descongelación repetidas, ya que afecta significativamente la recuperación en cultivo.

### **Siembra de especímenes para el aislamiento de *Legionella*.**

Las muestras respiratorias bajas pueden ser agrupadas en:

A) Secreciones respiratorias contaminadas: esputo expectorado y muestras del tracto respiratorio inferior contaminadas con microbiota del tracto respiratorio superior, como aspirados, lavados o cepillados bronquiales.

B) Secreciones respiratorias no contaminadas: muestras del tracto respiratorio inferior no contaminadas, como las obtenidas con cepillo telescópico y por aspiración pulmonar transparietal.

C) Tejidos: tejido pulmonar obtenido por biopsia o necropsia, o tejido de otros

órganos.

D) Otras muestras menos frecuentes, como líquido pleural, líquido cefalorraquídeo (LCR) o sangre.

Los especímenes de sitios estériles no deben ser pre-tratados. Las muestras no estériles, y muy contaminadas como el esputo, pueden ser sometidas a un pre-tratamiento para disminuir la microbiota acompañante que puede inhibir el desarrollo de *Legionella* o presentar dificultad al momento de observar colonias sospechosas.

### **Pre-tratamiento para muestras clínicas no estériles**

El mayor inconveniente para la recuperación en cultivo de *Legionella* spp. es que la presencia de bacterias o levadura que crecen más rápido que *Legionella* puedan inhibir su desarrollo. Para muestras clínicas no estériles, se recomienda la siembra directa y la siembra de una alícuota de la muestra pre-tratada por alguno de los métodos descontaminantes que se detallan a continuación:

### **Tratamiento ácido con solución KCl-HCl, pH 2.2**

#### Preparación de soluciones madres

Solución A: 0.2 M KCl (14.9 g/L en agua destilada estéril).

Solución B: 0.2 M HCl (20 ml de HCl fumante, 37%, en 80 ml de agua destilada estéril).

#### Preparación de solución de trabajo

Mezclar 25 ml of 0.2 M KCl con 3.9 ml de HCl para obtener una solución ácida

de trabajo de pH 2,2 aproximadamente. Esterilizar por filtración.

#### Descontaminación del espécimen

Preparar una dilución 1:10 del espécimen en solución ácida. Agregar 0.1 ml del espécimen a un tubo con 0.9 ml de la solución ácida. Homogeneizar con vórtex por aproximadamente 5 segundos. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después de incubar, sembrar inmediatamente.

#### **Tratamiento térmico**

Calentar durante 30 min en baño térmico a 50 ° C. Se obtienen resultados similares calentando las muestras en un baño de agua a 60 ° C durante 1–2 min.

Para muestras muy contaminadas, se recomienda el tratamiento térmico seguido de la descontaminación ácida.

#### **Dilución**

La dilución de la muestra también se puede utilizar para reducir los contaminantes, como por ejemplo, los inhibidores de *Legionella* propios de la muestra y antibióticos. Las diluciones recomendadas para distintos tipos de muestras clínicas se detallan en el cuadro 2. Se recomienda la siembra en dos placas, de la muestra sin dilución y diluida.

**Cuadro 1: Especímenes clínicos aceptables para cultivo y/o PCR**

<b>Espuito</b>	<p><u>Espuito obtenido por expectoración:</u> Evaluar la calidad de la muestra (Volumen mínimo 600 µl) y seleccionar el mejor material para estudio según los siguientes criterios, si varios esputos del mismo paciente fueron remitidos en la misma fecha.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Primera expectoración de la mañana</li> <li>- Sanguinolento</li> <li>- Purulento</li> <li>- Observación microscópica: no descartar si la reacción inflamatoria es escasa o ausente</li> </ul>
	<p><u>Espuito obtenido por aspiración:</u> Todas las muestras deben ser estudiadas</p>
<b>Aspirados</b>	<p>Nasotraqueal Endotraqueal Transtraqueal Punción percutánea de pulmón Endobronquial</p>
<b>Especímenes</b>	<p>Lavado bronquial</p>

<b>tomados con broncoscopio</b>	Cepillado Biopsia
<b>Biopsia</b>	Transbronquial Por cirugía a cielo abierto Otras (Ej. Renal, hepática, etc.)
<b>Fluidos</b>	LCR Pericárdico Peritoneal Pleural
<b>Heridas o materiales de absceso</b>	Aceptado si el cultivo para gérmenes comunes es negativo
<b>Necropsias</b>	Pulmón Otros tejidos
<b>Cortes de tejidos embebidos en parafina</b>	Este tipo de muestra puede ser utilizada para detección de ADN de <i>Legionella</i> spp por PCR. Des-parafinar por dos pasajes a través de xileno, seguido de dos lavados a través de alcohol absoluto y agua y realizar la extracción y purificación de ADN

**Cuadro 2: Diluciones recomendadas para especímenes clínicos**

<b>Espécimen</b>	<b>Dilución recomendada</b>
Esputo	1:10
Aspirado endo y nasotraqueales	1:10
Aspirado transtraqueal	1:5
Aspirado bronquial con cepillo protegido	1:5
Aspirado pulmonar	1:5
Biopsia pulmonar	disgregar y dilución 1:5
Líquido pleural	centrifugar si > 1ml
LCR	centrifugar si > 1ml
Lavado bronquial y líquido de lavado	centrifugar si > 1ml
Cepillado bronquial	homogeneizar y centrifugar
Biopsia transbronquial	disgregar y dilución 1:10
Material de autopsia	disgregar y dilución 1:10

Las partes purulentas del esputo pueden ser inoculadas en medios de cultivo luego de una dilución 1:10. Sin embargo, es preferible el tratamiento de la muestra con algún agente mucolítico. El uso de solución salina y / o lidocaína durante el muestreo y los agentes mucolíticos pueden inhibir el crecimiento de *Legionella*; por lo tanto, se requiere un paso de lavado con agua destilada estéril después de la fluidización. Si se va a utilizar la misma muestra para el método de PCR, el paso de lavado debe realizarse con agua de calidad biología molecular libre de ADN.

### Exámen microscópico

El exámen microscópico para evaluar calidad de la muestra de esputo antes de cultivar, es una práctica estándar en los laboratorios de microbiología. Sin embargo, ante la sospecha clínica, el esputo debe ser cultivado, aunque no presente reacción inflamatoria, ya que la mayoría de los pacientes con legionelosis no producen esputos purulentos.

### Medios de cultivo

Para el cultivo de *Legionella* spp. se utiliza el medio BCYE (medio éxtracto de levadura carbón tamponado con alfa-cetoglutarato) es un medio de cultivo formulado para el crecimiento in vitro de *Legionella* que contiene elementos claves para el crecimiento de la bacteria como hierro y cisteína. También se utiliza un medio selectivo suplementado con antibióticos, BMPA (BCYE suplementado con polimixina, cefamandol y anisomicina), medio MWY (Wadowski-Yee modificado) que es BCYE suplementado con glicina, vancomicina, polimixina B y anisomicina o agar GVPC (BCYE suplementado con Glicina 0.3%, polimixina B 100 U/ml, vancomicina 5 ug/ml y cicloheximida 80 ug/ml).

Se recomienda utilizar placas listas para usar comercializadas por varias empresas. En caso de preparar el medio *in house*, es muy importante ajustar el pH con una solución e KOH 1N monitoreando con pH metro hasta lograr un pH 6.9 +/- 0.2.

La composición del medio BCYE $\alpha$  es la siguiente:

Ingredientes	g/L
Extracto de levadura	10.0 g
Buffer ACES	10.0 g
Carbón activado	2.0 g
Hidroxido de potasio	2.8 g

Alfa-cetoglutarato	1.0 g
L-cisteína	0.4 g
Pirofosfato férrico	0.25 g
Agar	12.0 g

pH final (a 25°C) 6.9±0.2

Algunos medios comerciales incluyen el agar base BCYE con alfa-cetoglutarato deshidratado y luego de la preparación y esterilización a 121°C por 15 minutos, se añaden un vial que contiene una solución estéril concentrada de L-cisteína y pirofosfato férrico para obtener la concentración final adecuada. Estas soluciones pueden ser preparadas *in house*. En caso de prepararse la solución madre de L-cisteína y pirofosfato férrico, es conveniente prepararlas el mismo día y esterilizarlas por filtración. Una vez esterilizado el medio base, se debe mantener a 50-60°C y añadir en forma aséptica, primero la solución de L-cisteína y luego la solución de sal férrica. Plaquear por lo menos 25 ml por placa. Una vez preparadas, las placas se pueden conservar a 2 a 8°C hasta 1 semana.

### Aislamiento e identificación

Para evitar retrasos en el diagnóstico, se sugiere realizar cultivo directo (placa de muestra respiratoria directamente sin pretratamiento) y cultivo de muestra pretratada. Se siembra una alícuota de 100 microlitros de la muestra sin y con pretratamiento (si corresponde) directamente en la placa de BCYE y se incuba a 35 ± 2°C en atmósfera de 2.5% CO<sub>2</sub> (o sin CO<sub>2</sub>). Es importante no incubar a concentraciones de CO<sub>2</sub> mayores a 2.5% porque pueden inhibir el desarrollo de *L. pneumophila*. Si no cuenta con incubadora de CO<sub>2</sub> que permita regular la concentración del gas, es preferible incubar en estufa común.

Las placas deberían ser observadas diariamente o al menos al día 3, 5 y 10 de incubación. Las placas se incuban hasta 14 días para confirmar ausencia de desarrollo de *Legionella* spp. Las colonias generalmente son visibles macroscópicamente después del día al 5 de incubación. La presencia de colonias a

las 24 horas, está relacionada con el desarrollo de algún microorganismo acompañante.

Las colonias jóvenes miden de 0,5 a 1,0 mm de diámetro, son planas, lisas y tienen una apariencia típica de vidrio esmerilado y un tono iridiscente. Las colonias más viejas aparecen opacas, con un centro blanco y con márgenes mal definidos (Figura 1). Las colonias que desarrollan en medio BCYE suplementado con cisteína luego del día 3 de incubación, pueden ser repicadas en placas de medio BCYE sin cisteína o en agar sangre, si no desarrollan en dicho medio, son muy sospechosas de corresponder a *Legionella* spp. y pueden ser confirmadas como *Legionella* spp por PCR. La identificación a nivel de género y especie se realiza mediante la amplificación y secuenciación del gen *mip*.

Las colonias pueden ser identificadas como *Legionella* spp. en forma rápida y precisa por espectrometría de masas MALDITOF-MS con las plataformas Microflex, Bruker y Vitek MS (BioMerieux). La confirmación de especie debería realizarse por secuenciación del gen *mip*.

**Figura 1: Colonias de *L. pneumophila* en BCYE, 4 días de incubación**



Foto: Servicio Bacteriología Especial, Departamento de Bacteriología, INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"



### 10.3 PRUEBAS SEROLÓGICAS

Los estudios sobre la respuesta inmune a *Legionella* indican que durante la infección existen respuestas inmunes humorales específicas de antígeno y mediadas por células. La mayoría de los pacientes desarrollan respuestas tanto de IgG como IgM, pero algunos desarrollan un tipo único de anticuerpo, ya sea IgM, IgG o IgA, por lo que es necesario analizar la respuesta total de inmunoglobulinas y no solo IgG. Aunque la producción de inmunoglobulinas sigue el patrón general para las enfermedades infecciosas, fueron documentados varios casos de legionelosis en los cuales los pacientes presentaron títulos altos persistentes de IgG e IgM. Por lo tanto, no es posible asignar un valor de corte confiable de un solo título de IgG o IgM como evidencia diagnóstica de legionelosis en curso o reciente. También se demostró reacción cruzada y falsos positivos en individuos con infección por *Bacteroides fragilis*, *C psittaci*, *P. aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística y en infecciones por micobacterias, micoplasmas, *Campylobacter* spp., *Haemophilus influenzae*, *C. burnetti* y *Rickettsia typhi*.

La seroconversión refiere a un aumento de cuatro títulos entre la fase aguda y convaleciente de la enfermedad. El segundo título debe ser mayor o igual a la dilución 1/128. La inmunofluorescencia indirecta (IFI) es considerado el método patrón de oro. Las muestras de sangre para la búsqueda de anticuerpos deben ser recolectadas por el método de rutina y remitidas al laboratorio a temperatura ambiente. Una vez obtenido el suero se debe fraccionar en alícuotas y congelar a -20°C. Es importante evitar los descongelamientos y congelamientos sucesivos ya que pueden alterar el título de anticuerpos.

La principal limitación de este método es que la cuadruplicación del título de anticuerpos entre suero de fase aguda y convaleciente puede llevar de 4 a 8 semanas, por lo cual se torna inviable como herramienta diagnóstica para el manejo clínico del paciente. Además, las condiciones de inmunosupresión pueden ocasionalmente retrasar o evitar que se produzca la cuadruplicación del título, a pesar de la existencia de una infección franca.

Reconociendo sus limitaciones, la serología sigue siendo relevante para la confirmación de legionelosis en aquellos casos en los cuales el antígeno urinario

resultó negativo y la bacteria no fue recuperada en cultivo. La serología también puede ser valiosa para investigaciones epidemiológicas, identificar patrones de enfermedad, estudiar potenciales brotes en curso y conocer la seroprevalencia general.

#### 10.4 DETECCIÓN DE ADN- PCR

La lista de genes utilizados, tanto en PCR comerciales como PCR caseras incluyen un segmento conservado de los genes ribosomales que codifican para las subunidades 5S y 16S, el espaciador 16S-23S, y/o el gen *mip*.

La sensibilidad y especificidad de la PCR para *Legionella* spp. depende del diseño de la metodología y el tipo de muestra utilizada. Para muestras del tracto respiratorio inferior, la sensibilidad es del 80% al 100% y la especificidad cercana al 100%. La sensibilidad de la PCR a partir de esputo y LBA no mostró diferencias significativas, lo cual es importante para estimular la derivación al laboratorio de una muestra de esputo junto a la orina, cuando el LBA no esté disponible.

El tipo de método de extracción y purificación de ADN a partir de las muestras también puede contribuir al valor de la sensibilidad de la PCR. Varios estudios compararon distintas estrategias de extracción de ADN de *Legionella* y demostraron que los métodos automatizados fueron equivalentes, y algunas veces superiores, a los métodos manuales.

La técnica de PCR a tiempo real (rt-PCR) ganó popularidad a principios de la década de 2000, y se ha utilizado para detectar y cuantificar *Legionella* tanto en muestras ambientales como clínicas.

Actualmente no hay consenso sobre el valor de un gen o marcador por sobre otro para la detección de *Legionella* a través de métodos genéticos, con excepción del gen *mip* que es ampliamente utilizado para la detección de *L. pneumophila* o de otras especies. La selección de los genes diana para los métodos moleculares depende de los objetivos específicos del laboratorio. En la última década se han desarrollado varias pruebas moleculares sindrómicas rápidas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, entre ellas la neumonía. Estos sistemas proporcionan información a los médicos en "tiempo real" sobre los patógenos presentes y su

probable sensibilidad a los antibióticos, al detectar también marcadores genotípicos de resistencia. Una de las limitaciones de alguno de estos métodos es que están diseñados para detectar sólo la especie *L. pneumophila*. En el Cuadro 3 se detallan los equipos comerciales para la detección molecular de *Legionella* aprobados por FDA hasta la fecha.

**Cuadro 3: Métodos moleculares comerciales aprobados por FDA para la detección de *Legionella* en muestras clínicas**

Equipo	Fabricante	Tiempo
Unyvero A50 System <sup>(1)</sup>	Curetis AG	< 5 h
BIOFIRE Filmarray System Pneumonia Plus Panel <sup>(2)</sup>	Bio Merieux	1 h
QIAstat-Dx Respiratory SARS-CoV-2 Panel <sup>(3)</sup>	Qiagen	2h

<sup>(1)</sup> [https://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/reviews/K191967.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K191967.pdf)

<sup>(2)</sup> [https://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/reviews/K180966.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K180966.pdf)

<sup>(3)</sup> [https://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/reviews/K183597.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K183597.pdf)

## 10.5 Protocolos de PCR convencional para amplificación (y secuenciación) de los genes *mip* y 16SrARN

### Extracción de ADN de colonia sospechosa (método de lisis alcalina):

1. Agregar **20 ul de buffer de lisis** en un tubo eppendorf de 1.5 ml y resuspender con pinche 3 a 4 colonias de cada muestra en su tubo correspondiente.
2. Colocar en el bloque térmico a 100°C durante **15 minutos**.
3. Centrifugar algunos segundos para bajar las gotas de condensación
4. Cumplido el tiempo, agregar **180 ul de agua estéril** a cada tubo, resuspender hasta
5. homogeneizar.
6. Centrifugar los tubos a velocidad máxima (**10000-13000 rpm**) durante **4 minutos**.
7. Utilizar el sobrenadante como templado.

8. Emplear inmediatamente o almacenar los tubos a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

**BUFFER DE LISIS** para preparar 100 ml:

NaOH 1N: 5 ml

SDS 10%: 2.5 ml

Llevar a volumen con agua calidad molecular

### Extracción de ADN a partir de muestras clínicas (Purificación por columnas)

Equipo: QIAGEN DNA Mini Kit, según instrucciones del fabricante o similar. Durante el procedimiento de extracción, incluir como control negativo, una muestra de 200 microlitros de agua destilada estéril. Se han descriptos falsos positivos por contaminación de las columnas de extracción. El control de extracción de ADN se realiza mediante amplificación del gen de la beta globina humana.

### Protocolo de PCR gen *mip* (Ratcliff y col 1998, Jarraud y col. 2012)

PRIMERS amplificación	Secuencia 5'-3'
Legmip_f	GGG RAT TVT TTA TGA AGA TGA RAY TGG
Legmip_r	TCR TTN GGD CCD ATN GGN CCD CC
PRIMERS secuenciación	Secuencia 5'-3'
Legmip_fs	TTT ATG AAG ATG ARA YTG GTC RCT GC

Reactivos	UI por 1 reacción
Buffer 10X	5
MgCl <sub>2</sub> 50 Mm	1.5
DNTPs 2.5 mM	4
Legmip_f (10 pm/ul)	1
Legmip_r (10 pm/ul)	1
Taq Polimerasa 5 U/ul	0.5
Agua destilada calidad biología molecular	33
ADN	4
VOLUMEN FINAL	50

PROGRAMA DE CICLADO		
96°C	3 min	1 ciclo
94°C	1 min	35 ciclos
58°C	2 min	
72°C	2 min	
72°C	5 min	1 ciclo

Los productos de PCR se analizan en gel de agarosa 2%. El tamaño del amplicón esperado es de **661 a 715 bp**, según la especie.

## Secuenciación

Para secuenciar el amplicón debe ser purificado y la reacción de secuenciación se realiza con el primer Legmip\_fs.

### Protocolo de PCR gen 16SrARN (Jonas y col., 1995, Cloud y col 2000)

PRIMERS amplificación	Secuencia 5´-3´
JFP	Agg gTT gAT Agg TTA AgA gC
JRP	CCA ACA gCT AgT TgA CAT Cg

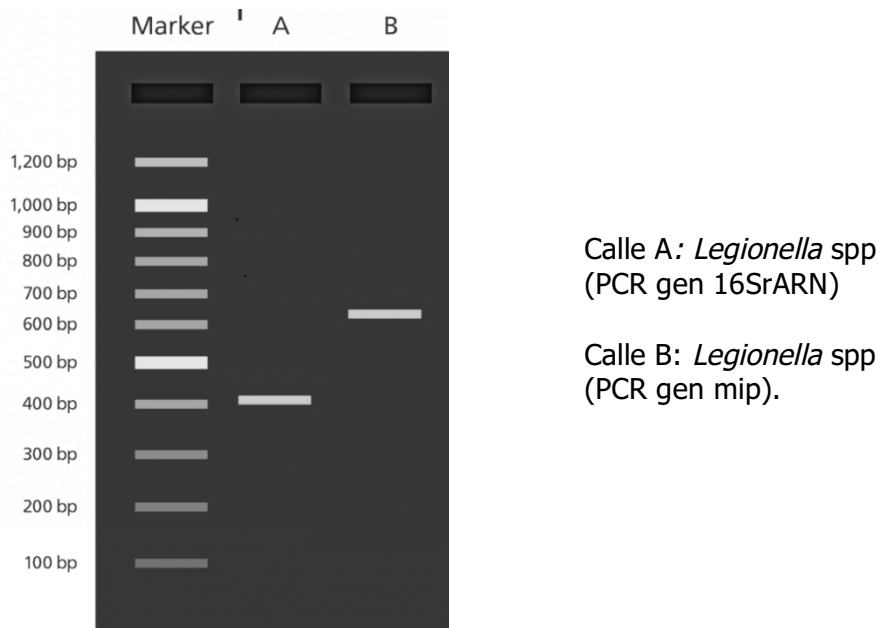
Reactivos	Ul por 1 reacción
Buffer 10X	5
MgCl2 50 Mm	1.5
DNTPs 2.5 mM	4
JFP (10 pm/ul)	5
JRP (10 pm/ul)	5
Taq Polimerasa 5 U/ul	0.4
Agua destilada calidad biología molecular	24.1
ADN	5
VOLUMEN FINAL	50

PROGRAMA DE CICLADO		
95C	5 min	1 ciclo
94C	1 min	40 ciclos
57C	1.5 min	
72C	1 min	
72°C	5 min	1 ciclo

Los productos de PCR se analizan en gel de agarosa 2%. El tamaño del amplicón esperado es de **380-400 bp**, según la especie.

## Secuenciación

Para secuenciar el amplicón debe ser purificado y la reacción de secuenciación se realiza con el primer JFP.



## 10.6 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

Actualmente los antibióticos recomendados son azitromicina o levofloxacina. Estas drogas son altamente eficaces y se han convertido en el pilar del tratamiento de legionelosis en individuos sanos e inmunodeprimidos.

Existen varios métodos para la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) tales como el método epsilométrico, la dilución en caldo, la dilución en agar y la difusión por discos. No obstante, ninguno de estos métodos se considera un estándar de oro. La determinación de la sensibilidad a los antibióticos de los aislados de *L. pneumophila* puede arrojar resultados que no se correlacionan clínicamente, debido a la característica intracelular de la bacteria durante la infección. Además, los medios de cultivo necesarios para cultivar *Legionella* pueden inactivar muchas drogas. **No hay indicación de realizar pruebas de sensibilidad para *Legionella* excepto en un laboratorio de investigación.**

## 11. SUBTIPIFICACIÓN MOLECULAR (PFGE)

La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) es un método de utilizado para genotipar aislamientos de *Legionella*. Para realizar esta técnica se aísla ADN genómico bacteriano intacto, el cual se digiere con enzimas de restricción de corte poco frecuente. De este modo se produce un patrón de bandas característico, de entre 10 y 20 fragmentos, que representan todo el genoma. Este patrón de restricción permite determinar la relación clonal entre los aislamientos al compararlos entre ellos.

Reactivos y elementos necesarios:

Buffer de lisis; agarosa de bajo punto de fusión; Proteinasa K; buffer TE; buffer TBE; enzimas de restricción *Ascl* y *XbaI*; equipo de PFGE; solución de Gel Red; equipo transiluminador UV, tubos eppendorf 1.5 y 2 ml; micropipetas en el rango de 1 a 1000 ul; tips con filtro adecuados a las micropipetas; centrifuga; baño térmico con agitación; agua tridestilada; hisopos; tubos 13x100; densitómetro MicroScan u otro equivalente; tubos falcon 50 ml; moldes para plugs

#### **11.1. Preparación de *plugs*:**

Cultivar las células en agar base BCYE (suplementado con cisteína y hierro) a 35 °C por 24 h en atmósfera de 2.5 % CO<sub>2</sub>. Del desarrollo, resuspender colonias en 2 ml de buffer TE (10mM TRIS, 1mM EDTA, pH 8) hasta llegar a una concentración bacteriana entre 0.4-0.45 medida con el densitómetro Microscan. De esta solución tomar un volumen de 300 ul y mezclar cuidadosamente con 300 ul de una solución de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5%. Colocar inmediatamente en moldes apropiados. Incubar a temperatura ambiente por 20 min hasta solidificar completamente.

#### **11.2. Lisis celular:**

Colocar los *plugs* generados en un tubo cónico con 5 ml de buffer de lisis (50 mM Tris [pH 8.0], EDTA 50 mM, Sarcosyl 1%) y 50 ul de una solución de Proteinasa K (20 mg/ml) e incubar durante 18 h en baño térmico a 54 °C con agitación.

Luego realizar 5 lavados sucesivos cada 30 minutos. Previo al primer lavado descartar el buffer de lisis y agregar 5 ml de ADDD a cada tubo, siempre manteniendo en baño térmico a 54 °C con agitación. Repetir el procedimiento una segunda vez con ADDD. Luego los siguientes 3 lavados realizarlos del mismo modo con buffer TE 1X. De esta forma se remueven los componentes del buffer de lisis y

los productos generados durante el proceso. Almacenar los plugs a 4 °C con buffer TE 1X hasta su uso.

### 11.3. Digestión enzimática:

Colocar un *plug* en un tubo eppendorf de 1.5 ml y agregar la mezcla de reacción de la enzima utilizada, de acuerdo al protocolo del fabricante.

Para digerir *plugs* de *Legionella* utilizar la enzima *Ascl* (30 U/*plug*). Por cada *plug* el volumen de la solución de restricción es de 200 ul. El periodo de incubación de la restricción es de 3 h en estufa a 37°C (*Ascl*-New England).

Como estándar de peso molecular de PFGE utilizar un *plug* de *Salmonella* Braenderup H9812 (protocolo *Pulsenet*). Para la digestión utilizar la enzima *XbaI* (30 U/*plug*). Por cada *plug* el volumen de la solución de restricción es de 200 ul. El periodo de incubación de la restricción es de 3 h en estufa a 37°C.

(*XbaI* – Fermentas)

### 11.4. Preparación de gel:

Preparar un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5% en buffer TBE 0.5X (Tris Base 0.9 M, Ácido bórico 0.89 M, 0.02 M EDTA). El volumen a preparar dependerá del tamaño del gel. Sembrar los *plugs* de *Legionella* y de *Salmonella* Branderup H9812 en los pocillos del mismo. El buffer utilizado para preparar el gel debe ser el mismo que se utiliza como buffer de corrida.

### 11.5. Condiciones de electroforesis:

Colocar el gel en la cámara de PFGE (ej., CHEDR II, Bio-Rad).

Condiciones de corrida: pulsotipos 1 – 50 s, temperatura constante de 14 °C, voltaje de 120 V, velocidad de la bomba 70 y tiempo de corrida gel pequeño: 18.5 h o gel grande: 19.5 h.

Finalizada la corrida, colocar el gel en una solución de Gel Red y teñir por 40 minutos. Visualizar y fotodocumentar el gel por iluminación con UV (312 nm) (ej., Gel-Doc, Bio-Rad).

Realizar el análisis del gel visualmente o con un *software* computacional (ej., BioNumerics, Applied Maths). Para el análisis utilizar criterios aceptados internacionalmente, por ej., si entre los patrones de digestión no hay bandas diferentes, los aislamientos son indistinguibles (no idénticos).



Los subtipos entre aislamientos se pueden asignar si los mismos difieren entre 1 y 4 bandas, y pueden definirse como relacionados.

## 12. PREGUNTAS FRECUENTES

**¿ A qué tipo de pacientes debería realizarse SIEMPRE diagnóstico de legionelosis ?**

- ✓ NAC con fracaso terapéutico
- ✓ Pacientes con neumonía grave, en particular aquellos que requieren cuidados intensivos.
- ✓ Pacientes inmunodeprimidos con neumonía.
- ✓ Pacientes con antecedentes de viaje (10 días anteriores al inicio de los síntomas, incluida una estadía en un centro de atención médica)
- ✓ Pacientes hospitalizados con neumonía asociada a la atención médica.
- ✓ Todos los casos de neumonía en el contexto de un brote.

**¿Cuándo es muy importante investigar legionelosis en casos de neumonía asociada a los cuidados de la salud?**

Quando otros pacientes fueron diagnosticados con legionelosis asociada al cuidado de la salud en los últimos 12 meses, cuando se ha aislado *Legionella* sp. en muestras ambientales en los últimos 2 meses y cuando hay cambios actuales en la calidad del agua que pueden conducir al crecimiento de *Legionella* (como bajos niveles de cloro)

**¿Cuándo se debe realizar la investigación para detectar la fuente de infección en instituciones sanitarias?**

- 1 caso de presunta legionelosis asociada al cuidado de la salud en cualquier momento
- $\geq 2$  casos de posible legionelosis asociadas al cuidado de la salud durante 12 meses en la misma instalación

**¿Cuáles son las medidas de control inmediatas para reducir el riesgo de transmisión de *Legionella* ante la sospecha de un brote?**

- ✓ Restringir las duchas; evitar piscinas de terapia y spas
- ✓ Para los pacientes trasplantados, usar agua esterilizada para cepillarse los dientes, beber y enjuagar los tubos de alimentación; para otros pacientes vulnerables, usar agua embotellada.
- ✓ No usar agua de los grifos en las habitaciones de los pacientes.
- ✓ No utilizar hielo de las máquinas de hielo de las instalaciones.
- ✓ Considerar detener nuevas admisiones o cerrar temporalmente el edificio o el área afectada.
- ✓ Asegurarse de que se implementen las respuestas de contingencia y las acciones correctivas.

**¿Existen tendencias climáticas, socioeconómicas o regionales asociadas con la legionelosis?**

La legionelosis sigue un patrón estacional distinto que difiere del de otras formas de neumonía, pero coincide con el de muchas enfermedades transmitidas por el agua con una incidencia máxima en el verano.

**¿Es más probable la transmisión de *Legionella* en ciertos tipos de edificaciones que en otras?**

Según los datos epidemiológicos, es más probable que se contraiga legionelosis en lugares públicos, como hospitales, hoteles y residencias de ancianos, que en los hogares. Sin embargo, estas observaciones pueden estar sesgadas porque los brotes de legionelosis se detectan más fácilmente en lugares públicos que en residencias privadas.

## 12. BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

Bopp CA, Sumner JW, Morris GK, Wells JG. Isolation of Legionella spp. from environmental water samples by low-pH treatment and use of a selective medium. *J Clin Microbiol.* 1981;13(4):714-719. doi:10.1128/JCM.13.4.714-719.1981

Cloud J, Carroll K, Pixton P, Erali M, Hillyard DR. Detection of Legionella Species in Respiratory Specimens Using PCR with Sequencing Confirmation. 2000. *J Clin Microbiol*, 38: 1709-12

Jarraud S, Descours G, Ginevra C, Lina G, Etienne J. Identification of Legionella in clinical samples. *Methods Mol Biol.* 2013; 954:27-56.

Jarraud S, Descours G, Ginevra C, Lina G, Etienne J. Identification of Legionella in clinical samples. *Methods Mol Biol.* 2013; 954: 27-56.

Mercante JW, Winchell JM. Current and emerging Legionella diagnostics for laboratory and outbreak investigations. *Clin Microbiol Rev.* 2015 Jan;28(1):95-133. doi: 10.1128/CMR.00029-14.

Pierre, D.M., Baron, J., Yu, V.L. et al. Diagnostic testing for Legionnaires' disease. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 16, 59 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0229-6>

Prieto M, Cipolla L, López B. En: Lopardo HA, Predari SC, Vay C (editores). Parte IIe. Bacterias Atípicas II, Capítulo IIe.2. Legionella. Manual de Microbiología Clínica de la Asociación Argentina de Microbiología. Buenos Aires, Argentina. AAM, 2021. ISBN 978-987-48142-2-7

Ratcliff RM, Lanser JA, Manning PA, Heuzenroeder MW. Sequence-based classification scheme for the genus Legionella targeting the mip gene. *J Clin Microbiol.* 1998 Jun;36(6):1560-7.

Shimada T, Noguchi Y, Jackson JL, Miyashita J, Hayashino Y, Kamiya T, Yamazaki S, Matsumura T, Fukuhara S. Systematic review and meta-analysis: urinary antigen tests for legionellosis. *Chest* 2009; 136:1576–85.

World Health Organization (2005) Manual de bioseguridad en el laboratorio 3 Ed. World Health Organization, Geneve.

World Health Organization (2018) Legionellosis. Disponible en línea:

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs285/en/>.

van der Zee A, Peeters M, de Jong C, et al. Qiagen DNA extraction kits for sample preparation for Legionella PCR are not suitable for diagnostic purposes. J Clin Microbiol. 2002;40(3):1126. doi:10.1128/jcm.40.3.1128.2002