

# Kasmera

Depósito legal ppi201502ZU4670

Esta publicación científica en formato digital es continuidad de la revista impresa Depósito

Legal: pp 196202ZU39 / ISSN:00755222

## REVISTA DEL DEPARTAMENTO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y TROPICALES ESCUELA DE MEDICINA / FACULTAD DE MEDICINA / UNIVERSIDAD DEL ZULIA

Vol. 43 Nº 2

Julio-Diciembre 2015

**KASMERA** es una revista científica que publica un volumen anual en dos números (Junio y Diciembre). Acepta artículos originales, notas, casos clínicos, monografías o revisiones, relacionados con Medicina Tropical y Microbiología (bacteriología, micología, parasitología y virología) en sus diferentes áreas: morfología, biología, inmunología, clínica, epidemiología y tratamiento.

**Director Fundador:** Adolfo Pons (\*) (1962-1978)

**Director Editor:** Ricardo Soto Urribarrí (1979-1997)

**Director Editor:** Reyes Alirio Torres (1998-2000)

**Directora Editora:** Belinda Calvo (Septiembre 2000-Diciembre 2012)

**Directora Actual:** Zulbey Rivero (desde Enero 2013)

**Co-Editor:** Rafael Villalobos

**Asistente del Co-Editor:** Angela Bracho

**Jefe del Departamento:** Rafael Villalobos

**Secretaria:** Ana María Moreno

### Comité editorial

Elieth Pozo                      Virginia Hazim                      Ángela Bracho  
Rafael Villalobos              Liliana Gómez

### Asesores científicos nacionales

Ada Martínez de Gallardo (Maracaibo)	Jaime Torres (Caracas)	Naillet Arráiz (Maracaibo)
Adriana Maldonado (Maracaibo)	Jeannette Vargas Semprún (Maracaibo)	Nereida Valero (Maracaibo)
Alisbeth Fuenmayor (Maracaibo)	Jesús Estévez (Maracaibo)	Néstor Añez (Mérida)
Ana Carvajal (Caracas)	José Castellano (Maracaibo)	Nieves Vargas de Caminos (Maracaibo)
Ana María Cáceres (Caracas)	Kutchinskaya Valero (Maracaibo)	Odelis Díaz (Maracaibo)
Arelis Lares de Acevedo (Maracaibo)	Ligia Botero de Ledesma (Maracaibo)	Orlando Nava (Maracaibo)
Arelis Lleras de Torres (Maracaibo)	Lila Rodríguez de Jiménez (Caracas)	Pedro Navarro Rojas (Caracas)
Armindo Perozo (Maracaibo)	Lissette Sandra (Maracaibo)	Reyes Alirio Torres (Maracaibo)
Belinda Harris de Reyes (Maracaibo)	Luciana Costa de León (Maracaibo)	Reyna Moronta (Maracaibo)
Belisario Gallegos (Maracaibo)	Ludonildo Lugo (Maracaibo)	Rodolfo Devera (Ciudad Bolívar)
Carolina González (Mérida)	Luz Mila Meza (Maracaibo)	Sofía Mata Essayag (Caracas)
Diana Callejas M. (Maracaibo)	Manuel Guzmán Blanco (Caracas)	Sofía Rodríguez de Valero (Maracaibo)
Digna Parra de Parra (Maracaibo)	Manzur Hassanhi (Maracaibo)	Sylvia W. de Magaldi (Caracas)
Elizabeth Prieto de Crespo (Maracaibo)	Maribel Castellano (Maracaibo)	Tania Romero Adrián (Maracaibo)
Ellen Acurero (Maracaibo)	Marinella Calchi La Corte (Maracaibo)	Tibaire Montes M. (Caracas)
Esmeralda Vizzie (Caracas)	Mario Comegna (Caracas)	Zulbey Rivero (Maracaibo)
Evelyn González de Morán (Maracaibo)	Marisol Sandoval (Ciudad Bolívar)	Zulibeth Rodríguez (Maracaibo)
Francisco Arocha (Maracaibo)	Maritza Pineda Sánchez (Maracaibo)	
Francisca Monsalve (Maracaibo)	Martín Hernández Arteaga (Maracaibo)	
Gerardo Vargas Morales (Maracaibo)	Marynes Montiel de Morales (Maracaibo)	
Glenis Chourio de Lozano (Maracaibo)	Merle Araujo de Fernández (Maracaibo)	
Helman Serrano (Maracaibo)	Mireya Mendoza (Caracas)	
Hernán Vargas Montiel (Maracaibo)		
Iris Díaz Anciani (Maracaibo)		

### Asesores científicos internacionales

Zoilo Pires de Camargo (Brasil)	Sérgio Cimerman (Brasil)	Josep María Torres (España)
Julio César Carrero (México)	Olga Fishman Gompertz (Brasil)	Luis Thompson (Santiago de Chile)
Arnaldo López Colombo (Brasil)	Pedro Laclette (México)	Carlos Rodríguez (Rep. Dominicana)
José Manuel Echevarría (España)	Aníbal Sosa (U.S.A.)	

Analizada e indizada en: Revistas científicas y humanísticas de LUZ (RevicyhluZ) • Science Citation Index • LILACS/CD-ROM • CABI Publishing • EBSCO Publishing. Acreditada por FONACIT • REVENCYT •

**Kasmera** 43(2): 130 - 138, Julio-Diciembre 2015

---

## ***Legionella* spp. como agente etiológico de neumonía**

*Legionella* spp. as causal agent of pneumonia

**Sandrea-Toledo, Lisette<sup>1</sup>; Paz-Montes, América<sup>1</sup>;  
Fuenmayor-Boscán Alisbeth<sup>2</sup>; Piña-Reyes, Eyilde<sup>1</sup>;  
Ávila-Roo, Yeiny<sup>3</sup>; Nava-Díaz, Morella<sup>4</sup>**

---

<sup>1</sup>Practica Profesional de Bacteriología, Universidad del Zulia;  
<sup>2</sup>Catedra de Bacteriología Clínica, Universidad del Zulia; <sup>3</sup>Catedra  
de Bacteriología General; <sup>4</sup>Centro de Referencia Bacteriológico,  
Hospital Universitario de Maracaibo.

**Autor de correspondencia:**  
Lisette Sandra, e-mail: lsandreat@gmail.com.

---

### **Resumen**

Las especies de *Legionella* son reconocidas en el mundo como agentes etiológicos importantes de neumonía. En Venezuela su incidencia es desconocida. El propósito de este trabajo fue estandarizar e implementar las metodologías (Cultivo y Antígeno Urinario) en nuestro medio, con el fin de determinar la presencia de especies de *Legionella* spp. en pacientes con sospecha de neumonía que acudieron a la emergencia de adultos del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo (SAHUM). Para ello, se estudiaron 75 muestras de orina y esputo. Los esputos fueron cultivados en medios selectivos y no selectivos para *Legionella*. Se determinó el antígeno urinario específico para *Legionella pneumophila* serogrupo 1, mediante la técnica de inmunocromatografía rápida (Binax Now®). De las muestras de esputo cultivadas, solo 1 (1,33%) fue positiva y 7 (9,33%) muestras de orina resultaron positivas. Las metodologías utilizadas y estandarizadas en la presente investigación mostraron una elevada sensibilidad y permitieron la implementación de estas metodologías en el Laboratorio de Referencia Bacteriológico.

**Palabras clave:** *Legionella*; Neumonía atípica; Antígeno urinario.

## Abstract

*Legionella* species are recognized worldwide as important etiologic agents of pneumonia. In Venezuela the incidence is unknown. The purpose of this study was to standardize and implement methodologies (culture and Urinary Antigen) in our environment detect the presence of *Legionella* spp. in patients with suspected pneumonia who attended the emergence of adults at the University Hospital of Maracaibo (SAHUM). To do this, 75 samples of urine and sputum were studied. Sputum was cultured on selective and nonselective media for *Legionella*. Specific urinary antigen *Legionella pneumophila* serogrupo 1 was determined, by rapid immunochromatographic technique (Binax Now®). In cultured sputum samples, only one (1.33%) was positive and 7 (9.33%) were positive urine samples. Standardized methodologies used in this investigation showed high sensitivity and allowed the implementation of these methodologies in the Laboratory of Bacteriology Reference.

**Key words:** *Legionella*; Atypical Pneumonia; antigen.

## Introducción

Para el año 1976, tras un brote de neumonía en un hotel de Filadelfia, se produjo un total de 182 casos de neumonía en miembros de una legión americana en Filadelfia en los Estados Unidos de América, la cual fue conocida como la enfermedad del legionario. Un año después, en 1977, los científicos identificaron la bacteria previamente desconocida y fue denominada *Legionella pneumophila* (1).

Hasta la fecha han sido reconocidas 50 especies de *Legionella* y al menos 15 serogrupos de *L. pneumophila*. Los serogrupos de *L. pneumophila* 1 y 6 son los que con mayor frecuencia están asociados a enfermedades en el humano, aunque también se han señalado como patógenas otras especies como *L. micdadei*, *L. dumoffii*, *L. longbeachae*, aisladas principalmente en pacientes inmunodeprimidos con neumonía (2,3).

La mayoría de las especies de *Legionella* viven en agua y la transmisión a humanos ocurre a través de la inhalación de pequeñas gotas de agua (4,5). Sin embargo, existen numerosos factores que pueden favorecer la infección por este microorganismo; como en el caso de pacientes con enfermedad obstructiva crónica, fumadores, diabéticos, mayores de 50 años, inmunocomprometidos, transplantados y pacientes recibiendo quimioterapia (3). De igual forma, existen factores ambientales asociados con brotes de legionelosis, como es el caso de personas que trabajan o viven cerca de

torres de enfriamiento, uso de piscinas, entre otros (5,6,7).

*Legionella pneumophila* con sus diferentes serogrupos causan principalmente la enfermedad de los legionarios; aunque también, han sido asociados a otros cuadros clínicos como la fiebre de Pontiac, neumonía de Pittsburg, sinusitis, infecciones de heridas, de válvulas cardíacas, pericarditis, peritonitis, entre otras (8).

Se ha sugerido que *Legionella spp.* puede producir una infección respiratoria subclínica o moderada de tipo inespecífico, pues en adultos sin historia de neumonía puede detectarse una elevada prevalencia de anticuerpos frente a gran variedad de especies y serogrupos de *Legionella*. En algunas partes del mundo se ha observado que del 1 al 20% de los adultos presentan anticuerpos frente a serogrupos de *L. pneumophila* y otras especies, a una dilución 1:128 o mayor (9,10).

Se estima que, anualmente en los Estados Unidos son hospitalizadas entre 8.000 y 18.000 personas por Legionelosis (5). Durante la década 2000 – 2011 el CDC reportó un incremento del 279 %, siendo de 1.100 casos para el año 2000 y de 4202 para el 2011 (1,11).

La legionelosis es una enfermedad de baja incidencia, pero en algunos países ha adquirido importancia epidemiológica debido a su frecuencia en brotes tanto de la comunidad como en el medio ambiente intrahospitalario, donde se presenta como una enfermedad nosocomial grave principalmente en pacientes

inmucomprometidos. En ambos contextos, la enfermedad puede estar asociada a varios tipos de instalaciones y equipos, ya que las especies de *Legionella* son microorganismos ambientales capaces de sobrevivir en un amplio intervalo de condiciones físico-químicas, siendo su nicho ecológico natural las aguas superficiales, como lagos, ríos y estanques (8,10).

Según los datos disponibles en el Centro Europeo de Prevención y Control de Enfermedades (ECDC en su sigla inglesa), el brote de mayor dimensión se registró en la ciudad inglesa de Barrow, en 2002, afectando a 494 personas y el foco fue un sistema de aire acondicionado. Posteriormente, otro brote ocurrió en Murcia, en 2001, con un total de 449 casos, siendo la fuente de contaminación una torre de refrigeración hospitalaria (12).

En 2014, el brote de *Legionella* spp. en Portugal registro una mortalidad que supera la registrada en los brotes de Japón y Reino Unido. Según el último balance de la Dirección General de la Salud (DGS) de Portugal, 302 personas estaban enfermas con legionelosis y el número de muertos fue de 9. De igual modo, en España, en Octubre de 2014, según la Agencia de Salud Pública de Cataluña (ASPCAT), en un brote de legionelosis en Sabadell, el número de muertos fue de 10 (12). Y más recientemente (2015), en la ciudad del Nueva York, Estados Unidos, específicamente en El Bronx, una de las zonas más grandes de esa ciudad, se registró un brote que ha dejado 12 víctimas mortales y 128 infectados, según el Departamento de Salud de Nueva York (13)

En Venezuela, las infecciones respiratorias y específicamente las neumonías ocupan los primeros lugares dentro de las enfermedades con mayor morbilidad y mortalidad, siendo su etiología en la mayoría de los casos desconocida. Según el último anuario del Servicio de Epidemiología del Servicio Autónomo del Hospital Universitario de Maracaibo, los casos sospechosos de neumonías en niños son elevados y pocos son diagnosticados como positivos según cultivos bacteriológicos. Es por ello que, muchos de los casos sospechosos son diagnosticados como neumonías atípicas que requieren, muchas veces, hospitalización y aplicación de una terapia antimicrobiana incierta (14).

Es importante destacar, que en nuestro país son pocos los estudios realizados que relacionen las legionelas con neumonías atípicas. Esto quizás sea debido a múltiples factores, entre los que se pueden considerar la poca o nula disposición en la búsqueda de este microorganismo de manera rutinaria en los laboratorios microbiológicos; así como también, al hecho de que si no existe la sospecha de que *Legionella* spp. pudiera estar involucrada, pasara inadvertido solapando de este modo la situación real.

En base a lo anteriormente señalado, la presente investigación plantea como propósito estandarizar e implementar las técnicas de Cultivo y Antígeno Urinario, con el fin de determinar la presencia de especies de *Legionella* en muestras clínicas de pacientes con sospecha de neumonía, que asisten al servicio de microbiología del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo - Estado Zulia.

## Materiales y Metodos

**Población:** La población estuvo representada por 75 pacientes con sospecha clínica de neumonía que asistieron al área de emergencia de adultos del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo (SAHUM), durante el periodo marzo a julio de 2015. Para la inclusión de los pacientes se consideró que los mismos tuvieran síntomas de neumonía y que no recibieran tratamiento con antibióticos en el momento de la toma de la muestra.

**Tipos de muestras:** A los 75 pacientes participantes les fue solicitado una muestra de esputo para la investigación de especies de *Legionella*. De igual modo, les fue solicitada una muestra de orina para la determinación de *L. pneumophila* serogrupo 1, pero no fue posible recoger las 75 muestras de orina, pudiéndose recolectar solo 30 muestras. Ambas muestras fueron almacenadas en refrigeración hasta su procesamiento.

**Estandarización de las metodologías (estudio piloto):** Antes del procesamiento de las muestras antes mencionadas, se realizó una prueba piloto con el fin de estandarizar las metodologías en el Centro de Referencia Bacteriológico del Hospital Universitario de Maracaibo (CRB-SAHUM), para la cual se seleccionaron al azar 30 muestras de esputo

de las recibidas habitualmente para cultivo convencional en el mencionado laboratorio bacteriológico. De éstas, 12 fueron inoculadas con una cepa ATCC de *Legionella pneumophila* subespecie *pneumophila*, Nro. 33155, gentilmente donada por el Centro para el Control y Prevención de enfermedades (CDC) de Atlanta-EE-UU, a una concentración que fue visualmente comparada con el estándar 0,5 de McFarland. Las 18 muestras restantes se cultivaron como controles negativos. Las muestras de esputo fueron posteriormente cultivadas, incubadas y examinadas diariamente, siguiéndose las estrictas normas de Bioseguridad especificadas por el CDC.

De igual forma, para la estandarización de la técnica de antígeno urinario (Binax Now®) se seleccionaron al azar 20 muestras de orina entre las muestras que fueron recibidas en el CRB-SAHUM para su cultivo bacteriológico. De estas muestras, 10 fueron inoculadas con la cepa ATCC de *Legionella pneumophila* subespecie *pneumophila* Nro. 33155, siguiendo la técnica utilizada para las muestras de esputo y analizadas de acuerdo a la metodología descrita por la casa comercial (Binax Now).

**Control de Calidad de los Medios de cultivos:** Las placas de agar extracto de levadura-carbón amortiguado (BCYEa) y el medio selectivo (BMPAa), fueron preparados en el momento del procesamiento de las muestras, siguiendo un estricto control de calidad. El primer lugar se ajustó el pH del medio a 6.90, utilizando Hidroxido de Potasio (KOH) 1N o Ácido Clorhídrico (HCL) 1N; y en segundo lugar, se chequeó el crecimiento del microorganismo, utilizando la cepa control de *Legionella pneumophila* subespecie *pneumophila*, ATCC N° 33155.

**Cultivo Bacteriológico:** Las muestras de esputo fueron cultivadas en medio de agar extracto de levadura-carbón amortiguado (BCYEa) y en medio selectivo Agar de BMPAa, que contiene la misma base del BCYEa y antibióticos como Cefotaxima, Polimixcina B y Anisomicina (1).

A fin de reducir la contaminación de las muestras de esputo por microorganismos de la flora normal del tracto respiratorio superior, se realizó una descontaminación previa de la muestra de esputo mediante un lavado ácido antes de proceder a su inoculación en las placas con BCYEa y BMPA.

### Descontaminación por lavado ácido de las muestras de esputo:

Antes de someter la muestra a la descontaminación ácida, 3 a 5 gotas del esputo fueron inoculadas en las placas de BCYEa y BMPA. Posteriormente todas muestras fueron descontaminadas utilizando la metodología descrita sugerida por el CDC:

- 1) Agregar en un tubo con tapa de rosca estéril 4.5ml de solución ácida (KCL-HCL 0.2M) y añadir 0.5 ml de la muestra de esputo previamente licuada con un palillo estéril, cerrar y mezclar bien por inversión en una campana de seguridad. Dejar reposar a temperatura ambiente por 4 minutos.
- 2) Inocular un segundo conjunto de placas de BCYEa y BMPA, con 3 a 5 gotas de la muestra tratada.
- 3) Colocar las cuatro placas sembradas anteriormente de cada muestra, en bolsas de plástico permeables al CO<sub>2</sub> e incubar en una atmósfera de Microaerofilia (CO<sub>2</sub>) a 35 °C durante 3 semanas. Se examinó cada placa cada 2 o 3 días para evaluar el desarrollo de crecimiento bacteriano característico de especies de *Legionella*.

**Identificación de Especies:** Las colonias compatibles con *Legionella*, se subcultivaron en un medio de Agar Sangre de Carnero al 5% no suplementado y en una nueva placa de BCYEa. A partir de las colonias que crecieron en BCYEa pero no en Agar Sangre de Carnero, se realizó un frotis en láminas portaobjetos que fue fijado con metanol y coloreado utilizando la técnica de Gram modificado, en el cual se utilizó Carbolfucsina al 0.05 % durante un minuto para aumentar la contratinción.

El frotis fue observado microscópicamente con objetivo de 100X, en búsqueda de morfología celular característica de *Legionella*: bacilos gram negativos, delgados, débilmente teñidos. A partir de colonias aisladas en el medio de BCYEa compatibles con *Legionella* se realizaron las pruebas para identificación de serogrupos basadas en una reacción Antígeno – Anticuerpo y la formación de agregados de células bacterianas observable macroscópicamente (*Legionella* Antisera SEIKEN®). Esta prueba identifica: *Legionella pneumophila* con sus seis serotipos (1-6), *Legionella bozemani*,

*Legionella dumoffi*, *Legionella gormanii* y *Legionella micdadei*. Esta prueba se realizó siguiendo la metodología recomendada por el fabricante.

**Detección del Antígeno urinario de *Legionella*:** Se realizó la detección del antígeno específico de *Legionella pneumophila* en las todas muestras de orina estudiadas (30). Para ello se utilizó el estuche comercial Binax Now® fabricado por INVERNESS medical. Esta técnica se realizó siguiendo la metodología descrita por el fabricante.

Durante el proceso, la muestra reacciona con este conjugado previamente adsorbido en la tira reactiva provista por el fabricante. En el caso de que se dé un resultado positivo los anticuerpos específicos presentes en la membrana reaccionarán con la mezcla de conjugado. Antígenos del serogrupo 1 *L. pneumophila* capturados por los anticuerpos inmovilizados anti-serogrupo 1 *L. pneumophila* reaccionan con los anticuerpos conjugados. Los otros anticuerpos inmovilizados también capturados formarán una línea de control visible. Un resultado positivo se apreciará a los 10-15 minutos o menos dependiendo de la concentración de antígeno presente en la muestra de orina. Un resultado negativo de *Legionella pneumophila*, interpretado a los 15 minutos indica un resultado negativo. La interpretación de resultados se muestra de forma visual a partir de la presencia o ausencia de las líneas rojas coloreadas. Un resultado positivo se muestra con la aparición de las dos líneas, de control y del test, mientras que un resultado negativo únicamente aparecerá la línea de control. Si la línea de control no aparece a pesar de que aparezca la línea del test, indica que la prueba no es válida.

## Resultados

Según las normas establecidas por organismos internacionales (ASM SEIMC, entre otros.), el diagnóstico de legionelosis puede realizarse por aislamiento del agente causal a partir de muestras respiratorias, por detección de antígenos en muestras del foco de infección o de orina (donde se eliminan) o también mediante la detección de anticuerpos específicos, entre otros métodos (15).

Para el momento del presente estudio, en el Centro de Referencia Bacteriológico del Servicio Autónomo del Hospital Universitario de Maracaibo no existían protocolos estandarizados para la investigación de *Legionella*, lo que motivo la estandarización, implementación y seguimiento de las metodologías antes descritas en el mencionado laboratorio. Tanto la técnica de cultivo como la detección del Antígeno Urinario, mostraron una elevada sensibilidad, ya que todas las muestras previamente inoculadas con la cepa ATCC de *Legionella pneumophila* subespecie *pneumophila* Nro. 3315 fueron positivas.

Las metodologías fueron estandarizadas e implementadas con éxito en el laboratorio del Centro de Referencia Bacteriológico del SAHUM, ya que ambas técnicas (Cultivo y Antígeno urinario) permitieron la detección de la cepa ATCC N° 33155 de *Legionella pneumophila*, previamente inoculadas en las muestras de esputo y orina.

Como se observa en la Tabla 1, de las 75 muestras de esputo recibidas para el cultivo bacteriológico de *Legionella* spp., se obtuvo 1 (1,3%) aislamiento de *Legionella pneumophila*; mientras que de las 30 muestras de orina analizadas, 7 (9,3 %) resultaron positivas para *Legionella pneumophila* serogrupo 1.

**Tabla 1.** Resultados de los estudios para la detección de *Legionella* spp. n=75

ESTUDIO	NUMERO	PORCENTAJE (%)
<b>Cultivo Bacteriológico</b>		
<b>Esputo</b>	1	1,3
<b>Antígeno Urinario</b>	7	9,3

## Discusión

Como fue mencionado anteriormente, en el presente estudio el porcentaje de positividad para *Legionella pneumophila* fue mayor con la técnica de detección del antígeno urinario que con la técnica del cultivo. Cabe destacar que la cepa aislada a partir del esputo correspondió a un paciente que también fue detectado este microorganismos en la muestra de orina, por lo que el porcentaje de positividad total de *Legionella pneumophila* en los 75 pacientes estudiados fue de 9,33% (7 cepas), lo cual es comparable con lo reportado en otros países, como Francia, Holanda, Italia y Bélgica, donde la incidencia oscila entre 5 y 13% (9).

De igual modo, otras investigaciones han obtenido resultados similares a la presente investigación y han encontrado mayor porcentaje de positividad en las muestras de orina que por cultivo, como el reportado en los Estados Unidos de América, específicamente en la ciudad de Nueva York, durante el periodo 2002 a 2011, un total de 1.449 casos de legionelosis fueron confirmados, siendo predominantemente diagnosticado por la prueba del antígeno urinario (1409 / 87%), y solo el 5,7% (82) de todos los casos fueron confirmados por cultivo (8).

Se ha señalado que en los casos de sospecha de neumonía por *Legionella* debe realizarse el cultivo, por ser esta metodología considerada como la técnica de elección, que a pesar de tener una especificidad del 100%, su sensibilidad es baja (10 y 80%); aunque algunos autores, han reportado que este porcentaje podría ser aún mayor si las muestras a utilizar son las adecuadas. En referencia a ello, la Sociedad Española de Microbiología Clínica (SEIMC), considera que la baja sensibilidad del cultivo se debe, entre otros, a los siguientes factores: la naturaleza de la bacteria que crece con dificultad aún en medios selectivos, la limitada supervivencia de la bacteria en las muestras clínicas y la aplicación de una terapia antibiótica previa a la toma de muestra (15).

En relación a este último factor, es importante destacar que los pacientes participantes no estaban recibiendo terapia antimicrobiana para el momento de la toma de la muestra, pero no se garantizó que antes de la toma de la muestra no hubiesen recibido antibióticos, que una u otra manera, pudo haber influenciado y disminuido la posibilidad de aislar especies

de *Legionella* por ser estos microorganismos altamente sensibles a los agentes antimicrobianos (16, 17). De igual modo, se ha señalado que una muestra obtenida inadecuadamente influye de manera importante en los resultados esperados; y de hecho, se han sugerido criterios para seleccionar las muestras de esputo apropiadas para el diagnóstico de neumonía (18). 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 (19).

No obstante, algunos autores recomiendan cultivar todas las muestras para el diagnóstico de legionelosis (20). Sus 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 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 (21).

Otra de las desventajas del método de cultivo, es que cuando este es utilizado para el procesamiento de la muestra de esputo, que son las más comunes por su facilidad en la recolección de las mismas, los medios disponibles para el aislamiento primario de especies de *Legionella* no son altamente selectivos y permiten el crecimiento de microorganismos no deseados que pueden solapar el crecimiento de *Legionella* spp. por lo que se hace necesario un tratamiento ácido previamente antes de ser cultivadas con el fin de disminuir la flora respiratoria y así aumentar la posibilidad de aislar el microorganismo (15). Cabe destacar que en las placas sembradas con las muestras de esputo antes de ser decontaminadas se observó mayor número de contaminación que en aquellas placas que se cultivaron luego de ser sometidas al proceso de decontaminación ácida, lo que permite valorar la importancia de este pre-tratamiento. Sin embargo, no existe en la literatura información que confirme ni refute la eficacia del tratamiento ácido sobre el crecimiento de las legionelas en los medios de cultivo.

Es bien sabido que la identificación del agente etiológico involucrado en un proceso infeccioso facilita la aplicación y efectividad de

un tratamiento, lo que, al menos en nuestro país, en aun más relevante considerando la elevada resistencia en nuestro medio, y el posible uso de antimicrobianos de menor espectro. En el 2005, se publicó un trabajo de pacientes con neumonía no grave en edad militar, en quienes los resultados del Antígeno Urinario (Binax NOW) permitieron el tratamiento con amoxicilina sin ingreso hospitalario (22).

En referencia a lo anterior, Diederer y cols., (2009) consideran que detección del Antígeno Urinario para *Legionella*, es uno de los métodos más utilizados para el diagnóstico de la Enfermedad de los Legionarios, por su elevada sensibilidad y especificidad y rapidez en los resultados (23). Es bien sabido que, la prueba en orina no detecta infecciones causadas por otros serogrupos de *L. pneumophila* ni por otras especies de *Legionella*, y de igual modo, que un resultado negativo no excluyen la infección por serogrupo 1 de *L. pneumophila*; sin embargo, este serogrupo es la especie mayormente involucrada en la legionelosis (15,16,24),

Hay suficiente experiencia mundial para considerar que la investigación de antígenos en la orina constituye un avance en el diagnóstico precoz de ambas entidades y que posee una notable fiabilidad (25, 26). Quizás esto sea debido a que *Legionella* aparecen en la orina a los 2-3 días del inicio de síntomas clínicos y su excreción es variable según el paciente, pero puede prolongarse desde unos días a 2 meses, e incluso 1 año en algunos pacientes, sin influir la administración previa de antibióticos (20).

López y cols. (2001) al evaluar la utilidad de diferentes métodos de laboratorio en un brote por especies de *Legionella* spp. en España, señalan que el antígeno urinario permitió diagnosticar 201 casos (90,5 %). Los autores concluyeron que el diagnóstico rápido provisto por la detección urinaria de *Legionella* spp. es esencial para la evaluación de los pacientes y para el control de los brotes epidémicos (27).

No obstante, en España, San Miguel y cols. (2005) (28), reportan resultados inferiores (0,96%), a pesar de ser éste un país con un reconocido recorrido de brotes a lo largo de los últimos 10 años (12, 13). Los autores encontraron que de 1.249 pacientes, solo 12 fueron confirmados como *Legionella*. La determinación de antígeno de *Legionella* fue positiva en 9 casos, mientras que los 3 casos restantes resultaron

negativos y se concluyó que la enfermedad fue producida por un serogrupo diferente, ya que el kit utilizado para detección de antígeno urinario de *Legionella*, solo detecta el serogrupo 1 de *Legionella pneumophila* (28).

Es importante destacar que, la presente investigación, además de servir como base para futuras investigaciones, permitió la estandarización de las técnicas para la identificación de especies de *Legionella* en el centro de Referencia Bacteriológico del Hospital Universitario de Maracaibo, lo que permitirá diseñar planes y programas de control tendientes a obtener estadísticas que permitan dar a conocer la participación de *Legionella* spp., como agente etiológico de las neumonías atípicas en nuestra región.

Se recomienda realizar estudios donde la muestra del tracto respiratorio inferior sea de mayor calidad, como es el caso del Líquido Pleural tomada por un personal especializado, con el fin de disminuir el riesgo de contaminación con microorganismos del tracto respiratorio superior. De igual modo, se recomienda realizar pruebas serológicas y moleculares (PCR).

### Agradecimiento

Los autores quieren expresar su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad del Zulia (CONDES-LUZ) por el aporte de los materiales y suministros del Proyecto "Diagnostico Microbiológico de la Legionelosis".

### Referencias bibliográficas

1. Edelstein PH. *Legionella*. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Editor. Manual of Clinical Microbiology, 9th ed. Washington, DC. ASM Press. 2007. P. 835-49
2. Betancur C, Lema M, Arcila G. Neumonía por *Legionella* en pacientes con leucemia. Presentación de dos casos. Rev CES Med. 2011; 25(2): 213-20.
3. Mykietuk A, Carratala J, Fernández-Sabé N, Dorca J, Verdaquer R, Manresa F; Gudíol F. Clinical outcome for hospitalized patients with *Legionella pneumonia* in the

- antigenuria era: Influence of levofloxacin therapy. *Clin Infect Dis*. 2005; 40: 794-99.
4. Fields B, Benson R, Besser R. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15: 506–26. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.15.3.506-526.2002>. (Visitado: 2014, Septiembre 26).
  5. Heymann D. Legionellosis and nonpneumonic legionellosis. Editor. Control of communicable diseases manual. Washington (DC): American Public Health Association. 2008. 337–40.
  6. Greig J, Carnie J, Tallis G, Ryan N, Tan A, Gordon I, *et al*. An outbreak of Legionnaires' disease at the Melbourne Aquarium, investigation and case–control studies. *Med J Aust*. 2004; (180): 566–72.
  7. Beauté J, Zucs P, De Jong B. Legionnaires disease in Europe, 2009–2010. *Euro Surveill*. 2013; (18): 204-17.
  8. Farnham A, Alleyne L, Cimini D, Balter S. Legionnaires' Disease Incidence and Risk Factors, New York, New York, USA, 2002–2011., *Emerg Infec Dis*. 2014; 20 (11): 1785-1802.
  9. Vaqué J, Martínez X. Epidemiología de la Legionelosis. *Med Integral*. 2002; 40(6); 271-81.
  10. Stout J, Yu V. Nosocomial *Legionella* infection. In: Mayhall CG, editor. Hospital epidemiology and infection control. 2.<sup>a</sup> ed. Filadelfia: Lippincott Williams & Wilkins; 1999, p. 453-65.
  11. Adams D, Gallagher K, Jajosky R, Kriseman J, Sharp P, Anderson W. *et al*. Summary of notifiable diseases—United States, 2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2013; 60: 1–117.
  12. Centro Europeo de Prevención y Control de Enfermedades (ECDC). Disponible en: <http://www.ecdc.europa.eu/en/Pages/home.aspx>. (Visitado: 2015, Septiembre 18).
  13. Department of Health. Information of Healthy New York. Disponible en: <https://www.health.ny.gov/press/releases/2015/>. (Visitado: 2015, Agosto 19).
  14. Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo (SAHUM). Anuario de Epidemiología. Servicio de Epidemiología. Ministerio del Poder Popular para la Salud. 2014. Disponible en: <http://www.sahum.gob.ve/10075-a-todos-los-departamentos-divisiones-y-servicios/>. (Visitado: 2015, Agosto 19).
  15. Ausina V, Catalan V, Cercenado E, Pelaz Antolin C. Diagnostico Microbiológico y Control de la Legionelosis. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2005. p. 1-72. Disponible en: <https://www.seimc.org>. (Visitado: 2014, Septiembre 18).
  16. Alonso Fustel E, Artieda Arandia J, García Calabuig M, González Carril F. Protocolos de actuación frente a enfermedades infecciosas. Viceconsejería de Sanidad. Dirección de Salud Pública del Gobierno Vasco. 2008. p. 1-27.
  17. Cacho Calvo J, Meseguer Peinado M, Palomo A, Puig de la Bellacasa J. Diagnostico Microbiológico de las infecciones bacterianas del Tracto Respiratorio Inferior. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2007. p. 1-59. Disponible en: <https://www.seimc.org>. (Visitado: 2014, Septiembre 18).
  18. Murray PR, Washington JA. Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum. *Mayo Clinical Procedures*. 1975; 50(6):339-44.
  19. 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. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1995; 14(1):25-33.
  20. Ingram JG, Plouffe JF. Danger of sputum purulence screens in culture of *Legionella* species. *J Clin Microbiol*. 1994; 32(1):209-10.
  21. Ferrer A, Bellver P, Falco V, Royo P. Screening quality of respiratory samples and *Legionella pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 1995; 33(7):1971. Erratum in: *J Clin Microbiol*. 1995; 33(11):3082.
  22. Guchev IA, Sinopalnikov A, Klochkov OI, Kozlov RS, Stratchounski LS. Management of nonsevere pneumonia in military

- trainees with the urinary antigen test for *Streptococcus pneumoniae*: an innovative approach to targeted therapy. *Clin Infect Dis.* 2005;40:1608-16.
23. Diederer BMW, Bruin JP, Scopes E, Peeters MF, Ijzerman PF. Evaluation of the Oxoid Xpect *Legionella*. Text Kit for Detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 Antigen in urine. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(7): 2271-74.
  24. Murdoch DR. Diagnosis of *Legionella* infection. *Clin Infect Dis.* 2003; 36(1):64-9.
  25. Mandell LA, Bartlett JG, Dowell SF, File TM Jr, Musher DM, Whitney C, *et al.* Update of practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in immunocompetent adults. *Clin Infect Dis.* 2003; 37:1405-33.
  26. Alfageme I, Aspa J, Bello S, Blanquer J, Blanquer R, Borderías L, *et al.* Normativas para el diagnóstico y tratamiento de la neumonía adquirida en la comunidad. Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR). *Arch Bronconeumol.* 2005;41:272-89.
  27. López P, Chinchilla A, Andreu M, Pelaz C, Sastre, J. El Laboratorio de Microbiología Clínica en el brote de *Legionella* spp. en la comarca de Alcoy: rentabilidad de las técnicas diagnósticas. *Enfer Infecc Microbiol Clín.* 2001; 19(9); 435-38.
  28. San Miguel A, Calvo B, Alonso N, MA Mazón J. de Castro. Diagnostico serológico de neumonía por *Legionella*. Incidencia en un periodo de tres años en el área sanitaria oeste de valladolid. España”. *Rev Electron Biomed / Electron J Biomed.* 2005; 3: 13-22.
  29. Ruiz M, Arancibia S, Torres A. Infecciones Respiratorias en UCI. En: Torres A, Mensa J, Niederman MS. Springer-Verlag Ibérica Editores. 1999. p. 230-239.