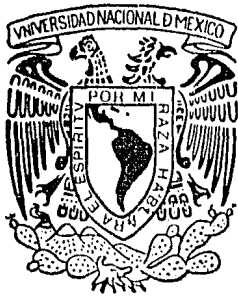


40
2 Gen



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"LEGIONELLA PNEUMOPHILA COMO CAUSANTE DE
LA ENFERMEDAD DE LOS LEGIONARIOS".

TRABAJO MONOGRAFICO

Para obtener el Título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a :
ROSA LINDA GALINDO SANTACRUZ

MEXICO, D. F.

1985.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	Pag
INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	3
1.- AGENTE ETIOLOGICO	3
1.1 Taxonomía	3
1.2 Morfología	8
1.3 Constitución química	14
1.4 Requerimientos nutricionales	21
1.5 Condiciones de crecimiento	32
1.6 Producción de toxinas	35
1.7 Susceptibilidad a agentes fisicoquímicos	44
2.- PATOLOGIA	53
2.1 Definición de la enfermedad	53
2.2 Cuadro clínico	53
2.3 Epidemiología	62
* Hábitat	62
* Distribución	65
* Condiciones predisponentes	73
2.4 Inmunología	76

	Pag
3.- DIAGNOSTICO DE LABORATORIO	82
3.1 Aislamiento	82
3.2 Identificación	88
4.- TRATAMIENTO	101
5.- COMENTARIOS	107
6.- BIBLIOGRAFIA	109

I N T R O D U C C I O N

A fines del verano de 1976 la atención de los Estados Unidos y de otros muchos países se enfocó sobre Philadelphia, Pennsylvania, a causa de una enfermedad con sintomatología respiratoria aguda que atacó a los delegados de la Legión Americana reunidos para la Convención Anual del Departamento de Pennsylvania, celebrada en el Hotel Bellevue - Stratford, del 21 al 24 de Julio del mismo año (57).

En los días siguientes cercanos a la convención, los participantes de ésta empezaron a mostrar síntomas de una extraña enfermedad caracterizada, en todos los casos, por acceso de tos, fiebre y las alteraciones físicas que integraban una neumonía. De los 4,400 participantes (delegados, familiares y otros), 200 enfermaron y el 15% de éstos murieron. Este hecho inició las investigaciones de la enfermedad en este país, la cual fue llamada enfermedad de los Legionarios.

En estudios posteriores se logró identificar al agente etiológico causal; se trataba de una bacteria Gram-negativa, pleomórfica, hasta entonces desconocida, pero que tiempo después recibió el nombre de Legionella pneumophila. Se le atribuyeron; además de dicha epidemia, dos brotes anteriores: uno en el año-

de 1965 en el Distrito de Columbia y otro en 1968 en Pontiac , - Michigan , junto con otros casos esporádicos en otras áreas territoriales.

Este trabajo se basa en la información recabada de los casos sucedidos en Estados Unidos, principalmente en los de Philadelphia, ya que hasta ahora en México no se han presentado o se ignora si ha existido. Por lo tanto, el objetivo es despertar el interés y fomentar el estudio de esta enfermedad, dando una visión amplia acerca de los signos y síntomas, así como características de la bacteria que la produce y el posible tratamiento.

GENERALIDADES

1.- AGENTE ETIOLOGICO

1.1 Taxonomía

Cuando se aísla un determinado microorganismo, independientemente de estudiar todas sus propiedades, surge el problema de clasificarlo, según las reglas de la taxonomía. En un intento - por encontrar una catalogación apropiada para la bacteria de la enfermedad de los Legionarios (BEL)* , Brenner y colaboradores (19. 57,76), sugirieron su clasificación basada en las siguientes pruebas :

- 1^a Hibridación del ADN de la BEL *
- 2^a Tamaño del genoma de la BEL
- 3^a Contenido de guanina-citocina en el ADN de la BEL
- 4^a Hibridación del ADN de la BEL con otras bacterias

Las cepas de la bacteria problema se dividieron en dos partes :

- a) Tres cepas aisladas de pacientes con enfermedad de los Legionarios.
- b) Tres cepas aisladas en el medio ambiente (ríos, torres-de enfriamiento, etc).

Dentro del criterio anteriormente mencionados, citan los au

* BEL Bacteria de la enfermedad de los legionarios. *

tores pruebas de hibridación del ADN de la bacteria problema con diferentes bacterias; la selección de estas últimas se hizo en base a la similitud del porcentaje de guanina-citocina reportado de las diversas bacterias, de tal manera que se observa una semejanza en dicho porcentaje con las siguientes bacterias:

Familia Enterobacteraceae

Pasteurella multocida

Francisella tularensis

Rochalimaea (Rickettsia) quintana

Vibrio spp

Aeromonas hydrophila

Staphylococcus epidermidis

Flavobacterium muningosepticum

Flavobacterium II B

Bordetella pertussis

Después de varias pruebas se obtuvieron resultados más confiables que reportaron Brenner y colaboradores (19), indicando que la bacteria contiene:

- a) 39% de la porción guanina-citocina.
- b) 2.5×10^9 daltons como tamaño del genoma de la BEL.

Conforme a estos datos, pusieron parámetros para poder re -

lacionarlos con otras bacterias, de tal manera que microorganismos que sobrepasan al 45% de la porción guanina-citocina quedaban excluidos del estudio.

Cronológicamente se llevaron a cabo diversos aislamientos de la BEL, de enfermos perfectamente bien diagnosticados, de manera que se planteó la interrogante de si se trataba de bacterias totalmente iguales morfológica y genéticamente.

Para comprobar dicha hipótesis se observó que las cadenas del ADN de la BEL de la cepa Philadelphia 1 se reasociaron a diversas temperaturas en un 100%, lo que demuestra su homología, siendo una prueba que carece de valor si se hace aisladamente; por lo tanto, se usó como control positivo para la reasociación de cadenas del ADN de diferentes cepas aisladas de la enfermedad de los Legionarios. Por ejemplo, la reasociación de la cepa Philadelphia I con la Albuquerque I a 60° C, demuestra un 94% de homología y a 75° C un 77% , lo que demuestra que el ADN de la primera cepa difiere de la segunda en un pequeño porcentaje, en el ordenamiento de sus bases del ADN. La tabla siguiente muestra la comparación entre las diferentes cepas aisladas de los casos estudiados.

TABLA N° 1 Relación del ADN de la cepa Philadelphia I con cepas sospechosas de la bacteria de los Legionarios y microorganismos de contenido similar de guanina-citocina (19).

FUENTES DE ADN SIN CLASIFICAR	Relación con el ADN Clasificación de - Philadelphia I		DIVERGENCIA
	60 °C	75°C	
BACTERIAS PHILADELPHIA I	100	100	0
ALBUQUERQUE I	94	77	3.0
FLINT I	93	71	1.9
BLOOMINGTON I	80	71	1.8
BLOOMINGTON 2 (a)	85	85	2.2
BLOOMINGTON 2 (b)	82	76	1.8
TOGUS I	85		
PASTEURELLA HAEMOLITICA KC 228	3		
P.UREAE KC 518	7	4	
CYTOPHAGA JOHNSONAE ATCC 29586	0	2	
C. JOHNSONAE ATCC 29588	0	0	
FLEXIBACTER CANADENSIS UASM 9D	0	0	
MICROCYCLUS MAJOR B859	3	0	
FAVOBACTERIUM 11B B6829	4	1	

Los múltiples estudios realizados con la BEL se basaron -
fundamentalmente en :

- 1.- Reacciones bioquímicas
- 2.- Tipo de crecimiento
- 3.- Pruebas del ADN (anteriormente mencionadas)

La realización de estas pruebas hace que la bacteria de los Legionarios se coloque como un nuevo género que incluye algunas especies. En estudios actuales las pruebas obtenidas son de tan profundo peso, que han clasificado a este microorganismo dentro de una nueva familia que se llama Legionellaceae.

Dentro de esta familia, la bacteria que tiene mayor importancia no sólo para nuestro estudio, sino por el interés médico en general, es Legionella pneumophila, nombre que se le dió por la enfermedad que causaba. El significado del nombre lo dieron Brenner y sus colaboradores (19).

Por sus raíces Legionella se divide :
Legion.- que significa Legion o ejército y ella que se refiere a algo.

pneumophila se divide en dos raíces que son :
Pneumos.- Pulmón y philos amor.

Resumiendo los datos anteriormente expuestos, la clasificación de esta bacteria se llevó a cabo por pruebas usuales, como son el crecimiento y pruebas bioquímicas ; aprovechando los avances técnicos de la genética se han podido catalogar perfectamente las diferencias de diversos ADNs por medio de las pruebas de hibridación, que son ampliamente específicas y que determinan con mayor exactitud la clasificación de las bacterias en familias, géneros y especies.

1.2 Morfología de la bacteria

Los estudios de microscopía óptica y electrónica realizados sobre Legionella pneumophila, han arrojado los siguientes datos; se trata de un bacilo pleomórfico Gram-negativo, que mide de 0.3 a 0.5 μ m de ancho por 2 a 5 μ m de largo en promedio, aunque estas medidas son un poco variables, pues se han reportado bacilos que miden hasta 8 a 20 μ m de longitud. Estudios de microscopía electrónica han demostrado que dicha bacteria presenta un diámetro promedio de 0.25 a 0.9 μ m (25, 32, 37, 54, 67, 126).

Membrana celular.

Para las diversas observaciones se han usado métodos de pre fijación con glutaraldehído, el cual tiene la propiedad de inmovilizar a la bacteria por reacciones de polimerización, técnica que permitió observar alrededor de la bacteria una membrana simple que concuerda con la de un bacilo Gram-negativo (54).

Otra técnica utilizada para determinar la morfología de la bacteria consiste en usar un complejo formado por glutaraldehído, formalina y cresol, el cual posee características similares a la técnica anterior, observándose también una membrana interna o citoplasmática perfectamente bien delimitada de la membrana externa. Esta técnica es bastante específica, porque se puede observar además que la membrana externa y la interna o citoplasmática, corren paralelamente alrededor de la célula y en determinados puntos se ven frecuentemente invaginaciones sobresalientes de la membrana externa. Estudios actuales han

mostrado que sólo en un 25 % de las cepas estudiadas se presentaban estas invaginaciones (54).

Para estudiar la rigidez entre la membrana externa e interna se utilizaron técnicas de plasmólisis empleando sacarosa al 20 % antes de la prefijación, de manera que se obtuvo un citoplasma contraído dejando un espacio muy grande entre éste y la membrana externa, por lo que las observaciones denotaron un mantenimiento en la estructura bacilar y varias adherencias entre la membrana interna o citoplasmática y la estructura exterior, datos que sugieren la presencia de una estructura rígida, interior a la membrana externa de la bacteria (54,67,90).

En 1979, Flesher y colaboradores (54) trataron de demostrar la existencia de ambas membranas en la bacteria, ya que se habían observado con microscopía electrónica, separando los diversos componentes celulares por medio de ultracentrifugación diferencial, asociando esta técnica a otra de ultrasonido y utilizando esferoplastos para la separación más específica de los componentes de la membrana. La separación la llevaron a cabo por medio de gradiente de densidad usando sacarosa a 250,000 Xg. Con estas sofisticadas técnicas se obtuvieron dos bandas: una de ellas a 1.23 g/cm^3 y otra menos densa a 1.20 g/cm^3 . Una vez separadas ambas bandas se estudiaron independientemente - obteniéndose los siguientes resultados: la banda más densa contenía cinco veces más ceto-dioxiocetato (KDO), que la banda menos densa; por lo que se concluyó que correspondía a la membrana externa. Se comprobó que la banda menos densa, indepen-

dientemente de contener KDO, tenía una elevada cantidad de -
deshidrogenasa succínica, dato que especifica que se trataba
de la membrana citoplasmática.

Estudios posteriores de ambas membranas con técnicas de -
ampliación de fotografías de microscopio electrónico y cálcu-
los computarizados, han hecho posible calcular aproximadamente
el tamaño de cada membrana; los promedios obtenidos son los -
siguientes: para la membrana externa 10 nm y para la membrana
citoplasmática $50 \pm 8 \text{ \AA}$. Se ha comprobado que entre una y -
otra membrana existe un espacio formado por peptidoglucanos-
que separan ambas membranas (25,54,67,90).

Pared celular

Se han hecho diversos estudios para profundizar sobre la-
constitución de la pared celular; en los primeros usaron diver-
sas enzimas (papaína, tripsina, pepsina, etc) para el recono-
cimiento de la secuencia de aminoácidos, estas investigaciones
han revelado que la pared celular está constituida por amino-
ácidos y azúcares unidos en forma de péptidoglucanos, compues-
tos que se encuentran en las bacterias Gram-negativas. En los
primeros intentos se trató de buscar el ácido diaminopimélico -
(ADP)*, ya que, como sabemos, es uno de los componentes esen-

ciales para estas bacterias y sólo en estudios posteriores con técnicas de cromatografía gas-líquido y usando varias cepas de Legionella pneumophila, se ha demostrado que el ADP* y la lisina sí existen en la bacteria, lo que reafirma aún más que efectivamente se trata de una bacteria Gram-negativa (54,71,126).

Conociendo la importancia del ADP *, se anexa la siguiente tabla que relaciona los porcentajes del ADP y la lisina en diferentes cepas de L.pneumophila.

TABLA N° 2 Contenido de ADP y lisina de células y fracciones - de pared celular tripsinizadas de BEL (71).

C E P A S	PORCENTAJE MOLAR DEL TOTAL DE AMINOACIDOS					
	C E L U L A S			FRACCION DE PARED CELULAR		
	ADP	LISINA	ADP/ LISINA	ADP	LISINA	ADP/LISINA
PONTIAC I	2.4	7.1	0.34	5.7	3.4	1.7
KNOXVILLE I	0.84	7.0	0.12	5.7	3.6	1.6
PHILADEL- PHIA 2	1.5	7.5	0.2	-a	-	-
PHILADEL- PHIA 3	1.6	7.2	0.22	-	-	-
FLINT I	1.4	6.7	0.21	-	-	-
BELLINGHAM I	1.4	6.7	0.21	-	-	-
PHILADEL - PHIA 4	-	-	-	4.0	3.2	1.3
Avg	1.5	7.0	0.2	5.1	3.3	1.5

a - No determinado

* ADP Acido diamino pimélico *

Flagelos

Las primeras investigaciones realizadas en esta bacteria no describen movilidad o presencia de flagelos, mientras que Thomason y colaboradores (157), al estudiar 41 cepas de aquellas encontraron a 33 cepas con flagelos y 18 de las 33 con " cintas colgantes ". Estas observaciones se confirmaron con tinciones específicas para flagelos, detectándose estos, curvos y rectos, en las diferentes cepas. La mayoría de las bacterias presentan flagelos polares, subpolares y muy pocas, flagelos bipolares. Así también en algunas bacterias se observan " cintas colgantes " delgadas y largas que parecen ser flagelos peritricos (Estos delicados apéndices parecen fimbrias salvo por su longitud poco común).

Para verificar la presencia de flagelos se incubaron cinco cepas de L. pneumophila en cajas de agar semisólido, observándose aquéllos en la superficie del agar, extendiéndose más allá de la periferia de la colonia.

Organelos Citoplasmáticos

Vacuolas.

En el interior de la bacteria y por técnicas muy actuales, como el uso del microscopio electrónico, se han podido distin-

guir estructuras que corresponden a vacuolas y sólo en cepas - aisladas de sacos vitelinos de embriones de pollo, no se pudieron observar dichas estructuras (25,67, 126).

Ribosomas

Otros elementos observados con las técnicas anteriormente mencionadas, son los ribosomas que se encuentran en forma libre y dispuestos al azar en la bacteria y que en ocasiones se agrupan observandose polisomas, es decir, conjunto de ribosomas (25, 67, 90, 126).

En investigaciones para los estudios de organelos se encontraron imágenes de madejas filamentosas que se distribuyen a lo largo de la bacteria; dichas imágenes hacen suponer que se trata de nucleoplasma, cuyo, contenido es de ácidos nucleícos (126).

Tipo de reproducción.

Como en la mayoría de las bacterias, el tipo de reproducción observado en L. pneumophila es la fisión binaria; se ha visto a los bacilos todavía unidos en la fase final de su división, así como la invaginación de la membrana citoplásmica (25, 90).

1.3 Constitución química de la bacteria.

En análisis muy detallados de Keel y colaboradores (90) - sobre la constitución química de L.pneumophila, se ha visto la presencia de un complejo de péptidoglucanos. Estudios de este material proporcionaron subunidades monoméricas características de estos péptidoglucanos bacterianos (ver tabla N° 3).

TABLA N° 3 Composición de péptidoglucanos de la bacteria causante de la enfermedad de los Legionarios(90).

AMINOACIDOS O AMINOAZUCARES	PROPORCION MOLAR A ALANINA A 2.0
ALANINA	2.00
ACIDO GLUTAMICO	1.14
ACIDO MURAMICO	0.51
GLUCOSAMINA	0.44
GLICINA	1.34
ACIDO ASPARTICO	0.97
SERINA	0.58
LISINA	0.66

Se observa que el ácido glutámico-alanina y el ácido murámico glucosamina se presentan en una proporción molar de 2:1 y 1:1, respectivamente; se ve también que los aminoácidos y azúcares presentes, están en concentraciones normales, pero no se detectó el ácido diaminopimélico (ADP), ácido muy importante porque puede servir como intermediario en la síntesis de lisina y ambos son conocidos para coexistir en las paredes de

bacterias Gram-negativas. En nuevas investigaciones se encontró el ácido diaminopimélico y todos los aminoácidos detectados anteriormente.

Con respecto a los ácidos grasos celulares se realizaron estudios de cromatografía gas-liquido y espectrometría de masas (122) con seis cepas de L. pneumophila, con los siguientes resultados: el ácido más abundante fue un ácido saturado de cadena ramificada de 16 carbonos (i-16:0), con la rama metil iso en un rango de concentración de 32 a 43 %. Los siguientes más abundantes fueron: un ácido mono insaturado con cadena lineal de 16 carbonos (16:1), un ácido de cadena ramificada de 15 carbonos (a-15:0) con la rama metilo en el átomo del carbono anteiso, un ácido saturado de cadena ramificada de 14 carbonos (1-14:0), un ácido saturado de cadena ramificada de 17-carbonos (a-17:0) y un ácido mono insaturado de 16 carbonos de cadena ramificada (i-16:1). Con la excepción de 16:1, se presentaron sólo en cantidades pequeñas a trazas ácidos de cadena normal ramificada saturada de (15:0, 16:0, 17:0, etc) y ácidos insaturados (14:1) (ver tabla N° 4).

Así el porcentaje total de ácidos grasos de cadena ramificada en cada uno de los seis cultivos, fue del rango de 81 a 90 % variando un poco, dependiendo de la cepa.

TABLA N° 4 Composición de ácidos grasos de varias cepas de -
L. pneumophila (122).

A C I D O S G R A S O S	% T O T A L D E A C I D O S											
	P H I L A D E L P H I A								F L I N T		P O N T I A C	
	1		2		3		4		1	2	1	2
1	2b	1	2	1	2	1	2					
i 14:0	11	12	13	11	14	14	10	13	11	11	11	12
14:1	T ^c	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
14:0	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
a 15:0	20	20	13	14	14	11	12	13	20	20	11	12
15:0	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
i 16:1	11	11	11	11	13	9	12	10	12	12	10	11
i 16:0	34	32	39	42	35	43	40	40	36	32	40	40
16:1	13	14	14	15	16	14	15	14	10	14	14	14
16:0	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
a 17:0	11	11	8	5	5	5	7	6	11	11	9	8
17A			2	2	3	4	4	4			4	4
17:0	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
Br 18:0	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
18:0	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
Br 19:0	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
19:0	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
Br 20:0	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
20:0	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
TOTAL DE ACI DOS DE CADENA RAMIFICADA	87	86	84	83	81	82	81	82	90	86	82	82

Se ha observado que la concentración de ácidos grasos en la bacteria está influenciada por la composición del medio de crecimiento, la edad del cultivo, la temperatura de incubación y otros factores. Wayne y Dees (170) realizaron el estudio anterior utilizando diferentes medios de cultivo y 36 cepas de dicha bacteria, llegando a los siguientes resultados: el ácido más abundante fué un ácido saturado de cadena ramificada de 16 carbonos (1-16:0) con la rama metil en el carbono iso; los otros se presentaron de la misma manera que en el estudio anterior. También se corroboró que el total de ácidos es de 81 a 90%. Además, en algunas cepas se encontraron pequeñas cantidades de un ácido ciclo propano de 17 carbonos en una concentración de 0 a 4%.

Se probó el efecto de la composición de los medios de crecimiento sobre los ácidos grasos celulares sin presentar diferencias cualitativas en dichos ácidos.

Se han encontrado varios fosfolípidos (53) con el siguiente orden decreciente de concentración: fosfatidil colina, fosfatidil etanol amina, cardiolipina, fosfatidil monometil amina, fosfatidil glicerol y fosfatidil dimetil etanol amina. Todos estos fosfolípidos tienen un papel muy importante, el promedio total de fosfolípidos fué de 96 micromoles por gramo de peso se-

co celular (ver tabla N° 5).

TABLA N° 5 Composición de fosfolípidos en la bacteria causante de la enfermedad de los Legionarios (53).

F O S F O L I P I D O S	BACTERIA DE LA ENFERMEDAD DE LOS LEGIO NARIOS.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
% Fosfatidil Etanol Amina.	24	31	28	31	30	31	35	31	28	31
% Fosfatidil monome- til amina	10	12	12	13	15	12	14	12	11	9
% Fosfatidil dimetil etanol amina	2	2	2	1	2	1	2	2	1	1
% Fosfatidil Colina	34	33	36	32	29	32	28	34	36	35
% Cardiolipina	21	14	13	12	14	15	12	13	14	15
% Fosfatidil glicerol	9	8	9	11	10	9	9	8	10	8
Total de fosfolípidos por gramo de peso seco celular μ mol/g	96	82	97	114	71	92	93	91	117	108

Los lípidos neutros que se encontraron fueron: ubiquinona, triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos y ésteres grasos.

En estudios de fracciones celulares de dicha bacteria, realizados por Wong y colaboradores (100), con técnica de cromatografía gas-líquido, no se detectaron ácidos grasos hidroxilados de importancia por su relación con las endotoxinas clásicas;

...; pero posteriormente W. Marberry (109) encontró la presencia de dichos ácidos, que fueron analizados por cromatografía de capa fina, de gas-líquido, por espectrometría infrarroja y espectrometría de masas.

Todas las cepas probadas produjeron aproximadamente 5 moles % (0.4 a 1 μ mol) de ácidos hidroxilados, incluyendo 1 mol% (0.1 a 0.3 μ mol) de ácidos dihidroxilados.

Los principales ácidos mono hidroxilados de L. pneumophila se identifica tentativamente como: ácido 3-Hidroxi-12 metil tri decanoico (ácido β hidroxilado iso mirístico) y ácido 3-hidroxil-eicosanoico (ácido β hidroxilado arachídico). Los ácidos menores mono hidroxilados parecen ser de la familia 3 hidroxilados; los dihidroxilados se identificaron como ácido 2, 3-dihidroxi-1, 2 metil tridecanoico (ácido α, β dihidroxilado isomirístico), mientras que el menor componente pareció ser el isómero de cadena lineal.

Así, se observó que L. pneumophila produce nuevos ácidos grasos 2, 3-dihidroxi, los cuales parecen ser únicos entre procariotes. Esto deberá ser estudiado con más detalle para ver si son una propiedad del género Legionella o exclusivamente de L. pneumophila.

En cuanto a la cantidad total de ácidos hidroxilados producidos,

permanecieron relativamente sin cambio con respecto a la cepa y al medio de crecimiento.

1.4 Requerimientos nutricionales

Como la bacteria causante de la enfermedad de los Legionarios, Legionella pneumophila, es muy exigente en sus requerimientos nutricionales, J.C. Feeley y sus colaboradores (51) en un estudio realizado, probaron 17 medios bacteriológicos diferentes para ver en cuál o cuáles se desarrollaba. El único medio favorable fue el agar Hinton-Mueller suplementado con 1% de hemoglobina y 1% de Isovitalax (MH/IH); éste fue analizado por J.C. Feeley y G. Gorman, para determinar los componentes requeridos que permiten el crecimiento del microorganismo.

Se empezó con los componentes químicos del Isovitalax, para ver cuál o cuáles de los doce productos que le constituían se necesitaban para su crecimiento. Para hacer el estudio se colocaron doce cajas cada una con un componente del Isovitalax por separado; y otras con todas las posibles combinaciones en la base de agar Hinton-Mueller con 1% de hemoglobina. Se observó que cuando se retiraban todos los componentes del Isovitalax, o bien cuando el clorhidrato de L-cisteína se suprimía del medio, la bacteria no se desarrollaba y que el aumento de Isovitalax o del clorhidrato de L-cisteína, al doble de la concentración original, aumentaba el crecimiento de L.pneu

mophila (ver tabla N°6).

TABLA N° 6 Crecimiento de L.pneumophila en agar Hinton-Mueller suplementado con 1% de hemoglobina y varios constituyentes de Isovitalex (51).

CRECIMIENTO DE CEPAS BEL ^b									
Compuestos del Iso- vitalex suprimidos - o adicionados.	concentra ^a ción g/l	químicos ^c suprimidos				químicos adicionados ^d			
		P1	P2	F1	Po1	P1	P2	F1	Po1
ADENINA	0.01	4	4	3	4	0	0	0	0
ACIDO p-AMINOBENZOICO	0.00013	3	4	4	3	0	0	0	0
COCARBOXILASA	0.001	4	4	3	4	0	0	0	0
CLORHIDRATO DE L-CIS- TEINA	0.0259	0	0	0	0	4	4	4	4
L-CISTINA	0.001	4	4	4	4	0	0	0	0
DEXTROSA	1.000	4	4	4	4	0	0	0	0
NUCLEOTIDO DIFOSFO- PIRIDINA (oxidada)	0.0025	4	4	4	4	0	0	0	0
NITRATO FERRICO	0.0002	4	4	4	4	0	0	0	0
CLORHIDRATO de GLUTA- MINA	0.100	4	4	3	4	0	0	0	0
CLORHIDRATO de GUA- NINA	0.0003	4	4	4	4	0	0	0	0
CLORHIDRATO de TIA- MINA	0.00003	4	4	3	4	0	0	0	0
VITAMINA B ₁₂	0.0001	3	4	4	4	0	0	0	0
TODOS LOS COMPUESTOS		0	0	0	0	4	4	4	4

a Concentración normal presente en el medio

b Crecimiento en un rango de 6 días en una escala de 0 a 4. P1- Philadelphia; P2 Philadelphia 2; F1, Flint 1; Po1, Pontiac 1.

c El medio contiene todos los compuestos de Isovitalex excepto el compuesto indicado.

d El medio está suplementado solamente con el compuesto del Isovitalex indicado.

Para ver si la hemoglobina podía ser remplazada por un compuesto simple, se prosiguió colocando en el medio concentraciones del 1% de soluciones de nitrato férrico, sulfato ferroso, cloruro férrico, sulfato de amonio férrico, fosfato férrico soluble, hematina, hemina y sangre de carnero, agregándole a todos 1 % de Isovitalex(ver tabla N° 7). Además de usar base agar Hinton-Mueller con concentraciones de 0.026 y 0.04 % de clorhidrato de L-cisteína, se incorporó nitrato férrico y pirofosfato férrico soluble, por separado, en concentraciones de 0.001 a 1 % para determinar su utilidad como fuente metabólica de fierro. Se encontró que con el nitrato férrico y pirofosfato férrico soluble, se intensifica el crecimiento de la bacteria, más que con la hemoglobina y las otras sustancias que contenían fierro. De esta manera se llegó a la nueva formulación de un medio, el cual lleva el nombre de agar Felley-Gorman, que se preparó substituyendo el Isovitalex y la hemoglobina por el clorhidrato de L-cisteína y pirofosfato férrico soluble respectivamente, más la base de agar Hinton-Mueller.

TABLA N° 7 Crecimiento de L.pneumophila en agar Hinton-Mueller suplementado con varios compuestos de hierro substituyendo a la hemoglobina (51).

CRECIMIENTO DE CEPAS DE BEL ^a

% de compuestos	nitrato ^b férico				fosfato ^b férico				pirofosfato ^b férico				pirofosfato ^c férico			
	P1	P2	F1	Po1	P1	P2	F1	Po1	P1	P2	F1	Po1	P1	P2	F1	Po1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.001	*	1	1	1	2	2	1	2	1	2	+	1	*	1	0	0
0.002	+	1	1	1	3	3	2	3	4	4	1	3	2	2	1	2
0.005	2	2	2	2	4	4	3	4	4	4	2	4	4	4	4	4
0.010	3	3	2	3	4	4	4	4	3	4	3	4	4	4	3	4
0.020	4	4	3	4	4	4	3	4	3	4	4	3	4	4	4	4
0.050	4	4	4	4	4	4	4	4	3	4	4	3	4	4	4	4
0.10	4	4	4	4	4	4	3	4	4	4	3	4	4	4	4	4
0.20	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3	3	3	4	4	4	4
0.50	0	+	+	+	3	3	2	1	1	2	*	+	3	4	3	3
1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	+	1	2	+	3

a Crecimiento en un rango de 6 días en una escala de 0.4 , + = 1 de crecimiento

b El medio contiene 0.026% de clorhidrato de L-cisteína

c El medio contiene 0.04% de clorhidrato de L-cisteína

d P1 Philadelphial ; P2, Philadelphia 2; F1, Flint 1; Po1, Pontiac 1.

Con el fin de optimizar el desarrollo de la bacteria sobre el agar F/G, se probó una serie de peptonas para observar frente a cuál de ellas presentaba mayor crecimiento dicha bacteria; las peptonas empleadas fueron: biosate, gelisate, -miosate, fitona, tripticase, casamino-ácidos, bactona-peptona, bacto-peptona N° 2, bacto-peptona N° 3, neopeptona, bactona-triptona y bacto-triptosa, en una concentración del 1%.

Se observó que L. pneumophila se desarrollaba únicamente en dos peptonas: biosate, compuesta de tripticase y extracto de levadura y la otra acidibase, más extracto de carne. En las otras peptonas mostró poco o ningún crecimiento (51, 52).

A este mismo agar se le agregaron compuestos de selenio a diferentes concentraciones (1 $\mu\text{g/ml}$ a 100.0 $\mu\text{g/ml}$) con el fin de observar cuál de éstos incrementan más el crecimiento; se utilizaron los siguientes compuestos: selenato de sodio, selenito de sodio y dióxido de selenio. Se observó claramente cómo el selenato de sodio aumentaba el crecimiento a las concentraciones de 5 a 10 $\mu\text{g/ml}$, mientras que las cajas con selenito de sodio y dióxido de selenio, tenían el mismo desarrollo que las cajas control de agar F-G; así mismo, esta adición del selenato de sodio, disminuía el tiempo en que aparecían las colonias sobre dicho medio (144).

Por modificaciones hechas al agar F-G, surge otro medio con el nombre de agar extracto de levadura carbón, al cual, - en lugar de acidificase, se le agregó extracto de levadura que va a servir como fuente de proteína. No se le adicionó extracto de carne ni almidón, pero en cambio contenía carbon activado.

Para ver cómo influía la concentración de carbón en el medio, se colocaron diferentes concentraciones, a diferentes condiciones de aereación llegando así a las que dan mayor - - crecimiento de L. pneumophila y que son 0.15% de Norit A y 0.-20% de Norit SG. Las primeras colonias que aparecieron en las cajas, fueron las incubadas en presencia de aire; sin embargo, se observó que aumentaban ligeramente si además se le adicionaba 2.5% de CO₂.

Así mismo se observó que el carbón funciona como un destoxificante, igual que el almidón, además de que puede funcionar como un colector de CO₂ y modificar la tensión superficial, pero no se ha logrado saber por qué el contenido de carbón aumenta el crecimiento de la bacteria en este medio, y sólo se confirma que sirve para absorber sustancias tóxicas (52, 134).

Se han desarrollado otros medios químicamente definidos,

AMINOACIDOS	P1	P2	T	B1	Bell	F1	D1	MB	Olda	A1
Acido aspartico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acido glutámico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glutamina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Histidina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lisina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Triptofano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asparagina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

a +, no hubo crecimiento en la ausencia de los aminoácidos probados; -, hubo crecimiento igual al observado en las cajas de control en la ausencia de los aminoácidos, probados; + hubo crecimiento en la ausencia de los aminoácidos pero menor que en las cajas control.

b Hubo crecimiento en uno o dos tubos después de 72 hrs.

c Fenil alanina o tirosina presenta crecimiento; uno puede sustituirse por el otro.

d P1, Philadelphia 1; P2 Philadelphia 2; T, Togus; B1, Bloomington 2; BELL, Bellingham; F1, Flint 1; D1, Detroit; MB, Miami Beach; Olda, A1, Angeles 1.

Según J. Richard George y colaboradores (66) las cepas de L. pneumophila usan serina y en mayor grado treonina como la única fuente de carbón y energía.

La cisteína puede ser sustituida por L-cistina o glutatona pero no por D-cisteína. Se ha visto que para el crecimiento de la bacteria se necesita piruvato y ácido ceto-glutárico.

Se realizó un experimento en un medio mínimo de aminoácidos, para ver si las cepas de L. pneumophila se desarrollaban después de varios pases y se encontró que, en el primer pase, hubo el mismo desarrollo en todas las cepas, al igual que en el medio que contenía 20 aminoácidos (66); pero a medida que los pases seguían, se fue notando la diferencia entre el desarrollo de las cepas (ver tabla N° 9), lo que indicó que el requerimiento puede ser parcial para uno de los aminoácidos omitidos. Después se fue agregando cada uno de los aminoácidos que faltaban en este medio mínimo, y se vió que cada uno contribuía en cada cepa para alcanzar el máximo de crecimiento.

TABLA N° 9 Crecimiento de L. pneumophila en un medio mínimo definido (66).^a

CEPAS	A B S O R B A N C I A b					
	PASE 1		PASE 2		PASE 3	
	COMPLETO	MINIMO	COMPLETO	MINIMO	COMPLETO	MINIMO
Philadelphia 1	0.660	0.550	1.230	1.125	1.215	0.950
Philadelphia 2	1.085	0.785	0.985	0.770	1.010	0.905
Togus	1.040	0.690	0.975	1.000	0.940	0.855
Bloomington 2	0.570	1.295	0.550	0.540	0.755	0.715
Bellingham	1.115	0.890	1.200	1.066	1.230	1.190
Fliht 1	0.935	0.795	1.095	1.100	1.160	0.930

CEPAS	PASE 1		PASE 2		PASE 3	
	COMPLETO	MINIMO	COMPLETO	MINIMO	COMPLETO	MINIMO
Detroit 1	0.850	0.620	0.680	0.574	0.695	DNG ^c
Miami Beach	1.090	0.835	1.130	1.040	0.590	0.620
Olda	1.005	0.710	0.725	0.565	0.535	0.110
Los Angeles 1	0.670	0.640	DNG	DNG		
a.- Mínimo con respecto a los aminoácidos necesarios para el crecimiento.						
b.- Absorbancia medida a 660 nm.						
c.- DNG, no hubo crecimiento.						

Según William J. Warren y R. Miller (169), las vitaminas, - cofactores, purinas y pirimidinas, no tienen efecto sobre el crecimiento de esta bacteria ya que posee la capacidad para sintetizar todas las vitaminas, coenzimas y nucleótidos requeridos; pero Leo Pine y colaboradores (130) observaron que la completa supresión de todas las vitaminas, ácidos oleico y almidón, da un retraso de 90 horas en el crecimiento.

L. pneumophila no usa glucosa, polisacáridos, ni ácidos orgánicos como fuente de energía evidente para su crecimiento. Sin embargo, éste se ve inhibido totalmente por compuestos quelantes como citrato, malato, acetato, ácido etilendiaminotetraacético y moderadamente con mercaptoetanol, tioglicolato, y Tween 80.

Tison y colaboradores (161) mostraron que L. pneumophila -

crece en un medio de sales inorgánicas si se cultiva con cierta cianobacteria (alga azul-verde) con actividad fotosintetizadora. El crecimiento en el cultivo con la cianobacteria Fischerella ocurre en proporción similar que la obtenida en el medio completo. Esto sugiere que algunos metabolitos producidos por Fischerella son utilizados por L. pneumophila, y que sus requerimientos nutricionales no son tan estrictos como lo reportó Feeley y colaboradores (51). Estos resultados, más el hecho de que L. pneumophila se establece con frecuencia en el mismo medio ambiente que los microorganismos fotosintéticos, da una posible explicación de la amplia distribución de Legionella. Bottach G. y colaboradores (17) confirman el crecimiento exponencial, además de que las fracciones específicas del sobrenadante del cultivo cianobacteriano (rico en proteínas y carbohidratos) estimulan la fijación de oxígeno por Legionella.

Posteriormente estudiaron la adherencia de L. pneumophila para especies de Fischerella, concluyendo que esta bacteria no tiene adherencia específica ya que gran variedad de bacterias Gram-negativas, Gram-positivas y ácido resistentes también limitan a Fischerella (16).

1.5 Condiciones de crecimiento de la bacteria

Una vez que se determinaron los requerimientos nutricionales apropiados para L.pneumophila, se establecieron las condiciones físicas más favorables para su crecimiento óptimo.

Temperatura

Varias cepas de la bacteria de la enfermedad de los Legionarios se inocularon sobre agar MH-IH y se incubaron aeróbicamente a las siguientes temperaturas 25° , 29° ,35° y 42° C durante seis días; se observó que a 35° C se presentaba el máximo crecimiento de la bacteria, a 29° C era muy ligero y a 25° o 45° C no se presentó desarrollo alguno en ninguna cepa (51, 85). Por lo tanto, la temperatura óptima de crecimiento es de 35 a 37° C.

Aereación

Se inocularon varias cepas de L.pneumophila sobre agar MH-IH y se incubaron durante 6 días a 35° C en atmósfera con el 20, 10, 5 y 2.5 % de O₂ y anaerobicamente. Los resultados del experimento indican que las bacterias crecen mejor aeróbicamente con 2.5 % de CO₂; se observa también que el crecimiento disminuye con cada reducción de oxígeno, mientras que las condiciones anaerobias anularon la proliferación (51,85).

Según Pine y colaboradores (130) la bacteria es aerobio estricto, requiere de dióxido de carbono y una entrada constante de oxígeno y es potencialmente sensible a la aereación excesiva.

pH

Se prepararon cajas de agar MH-IH con pH desde 5.0 a 11.0 con incrementos de 0.5, las que se inocularon con cepas de L.pneumophila . El crecimiento se observó en el rango de pH de 6.5 a 7.5 resultando el óptimo, a pH 6.9 y 7.0 (ver tabla N° 10) (51).

TABLA N° 10 Crecimiento de cultivos de L.pneumophila a varios niveles de pH, sobre agar Hinton-Mueller, con 1% de hemoglobina suplementado con Isovitallex o clorhidrato de L-cisteína (41).

pH	Crecimiento de cepas de la BEL en un medio con: ^a 0.026% de clorhidrato de									
	1% de Isovitallex					L-cisteína				
b	P1	P2	F1	Po1		P1	P2	F1	Po1	
6.0	0	0	0	0		0	0	0	0	
6.5	3	4	3	4		3	3	4	3	
6.6	3	3	3	4		3	3	3	3	
6.7	3	4	3	3		3	3	4	3	
6.8	3	3	3	3		3	3	4	3	
6.9	4	4	4	4		4	4	4	4	
7.0	4	4	4	4		4	4	4	4	
7.1	3	4	4	3		3	3	4	3	
7.2	3	3	4	3		3	3	3	3	
7.3	4	4	4	0		3	3	3	0	

	1% de Isivitalex				L- cistefna			
	P ¹	P ²	F ¹	Pol	P ¹	P ²	F ¹	Pol
7.4								
7.5	3	3	3	0	3	3	3	0
8.0	0	0	0	0	0	0	0	0
<p>a El crecimiento se midió después de 6 días de incubación con una escala de 0a 4.</p> <p>b P1 Philadelphia 1; P2 Philadelphia 2; F1 Flint 1; Pol Pontiac 1.</p>								

1.6 Producción de toxinas

Los mecanismos por los cuales L.pneumophila causa la enfermedad no se conocen. Los disturbios pulmonares y extrapulmonares como en el Sistema Nervioso Central, que acompañan a la enfermedad, hacen pensar en que dicha bacteria puede causar el padecimiento por la producción de toxinas (4, 61, 69, 80, 124).

Se ha encontrado que L.pneumophila origina materiales semejantes a endotoxinas, hemolisinas y proteasas; sin embargo, hasta ahora el papel que desempeñan en la enfermedad no se conoce.

R.Friedam y colaboradores (61) describen una citotoxina producida en los filtrados de cultivos de L.pneumophila. Para demostrar la citotoxicidad se usaron tres cepas de la bacteria que se inocularon sobre un cultivo de células de ovario de hamster chino (CHO). Con el empleo del colorímetro se obtuvieron los siguientes resultados.

Se observó el cultivo al microscopio 24 horas después de la inoculación con la cepa Knoville; el primer cambio morfológico fue el redondeamiento de las células y el desarrollo pobre de una monocapa, a las 48 horas las células se volvieron redondas y muchas se degeneraron y se lisaron, liberando desechos celulares dentro del medio de cultivo; a las 72 horas se encontraron

todas las células degeneradas, al mismo tiempo que las células-control formaban una monocapa densa; las otras cepas Togus y Bloomington mostraron efectos similares de citotoxicidad.

Se realizaron algunas pruebas sobre la actividad de la citotoxina :

-Al calentar muestras de un filtrado de cultivo de L.pneumophi la a 37° y 56° C durante una hora o a 100°C durante 30 minutos, no se encontró pérdida de actividad, siendo muy estable a 34° y <70° C, lo que demuestra que la citotoxina es resistente al calentamiento y a la congelación.

-Acercas del efecto del pH sobre la actividad de la citotoxina, se vio que fué estable sobre el rango de pH 5 a 8, observándose una leve pérdida de la actividad después de la incubación a pH 1 a 3 y a pH 9, siendo considerable la pérdida arriba de pH 9.

- La citotoxina no pierde su actividad al realizarse una extrac ción con metanol (100 % recuperable), siendo soluble en éste.

- La citotoxina es dializable.

- Se probó cómo influían algunas enzimas proteolíticas en la actividad citotóxica de la fracción soluble en metanol, observándose que el tratamiento con tripsina no afecta la activi -

dad; en cambio, papaína y pronasa aumentaron la dosis citotóxica mínima (MCD). Estas propiedades sugieren que la citotoxina es un polipéptido de bajo peso molecular.

Anteriormente, Baine y colaboradores (4) reportaron que los filtrados de cultivos de L.pneumophila no presentaban citotoxicidad frente a las células de ovario de Hamster chino, aunque se debe tomar en cuenta que no se usó el mismo medio bacteriológico, ya que la producción de muchas toxinas bacterianas conocidas son dependientes del medio.

Wong y colaboradores (180) estudiaron también las propiedades endotóxicas de la bacteria de la enfermedad de los Legionarios (BEL) por medio de pruebas biológicas in vitro e in vivo. Observaron algunas discrepancias en los resultados de la prueba in vitro, con lisado limulus, pues se vió que el 48% del peso seco de la bacteria contenía sustancias parecidas a endotoxinas, mientras que con pruebas de pirógeno en conejos, sólo dió el 0.76%; no lograron encontrar la clásica endotoxicidad generalmente asociada a las bacterias Gram-negativas, concluyendo únicamente que la principal endotoxina de la bacteria, puede ser un tipo de lipopolisácarido bacteriano.

Baine y colaboradores (4,5) trabajaron con varias cepas -

de BEL para observar la hemólisis sobre agar Hinton-Mueller su -
plementado con sangre de cinco especies de mamíferos (cobayo, -
caballo, conejo, humano y carnero). La hemólisis fué visible des -
pués de 2 días de la inoculación de las cajas, siendo la más - -
intensa la del medio de agar con sangre de conejo o con sangre -
de cobayo, menos intensa sobre agar con sangre de caballo o car -
nero y todavía menos aparénte sobre agar con sangre humana.

La actividad hemolítica es una propiedad que poseen diver -
sas bacterias productoras de toxinas que atacan las membranas -
celulares. Esta actividad se probó en filtrados de líquido alan -
toideo de huevos infectados y se observó que resiste el calenta -
miento s 60° C durante 30 minutos y se presenta todavía después
del calentamiento a 100° C durante 15 minutos.

Se ha visto que fitrados de líquido alantoideo estéril, de -
huevos de gallina embrionados e inoculados con dicha bacteria,
muestran actividad hemolítica; la que no se presenta en huevos -
incubados no infectados paralelamente.

Se realizaron pruebas de actividad hemolítica en plasma y -
orina de conejos, a partir de animales inoculados por diferentes
vías, confirmándose dicha actividad en fluido alantoideo.

Las vías de inoculación que se emplean en conejos fueron:

- 1.- Inoculación intravenosa con fluido alantoideo infectado con L.pneumophila .
- 2.- Inoculación intranasal con células que desarrollaron en agar.
- 3.- Inoculación intranasal con tejido esplénico de cobayo infectado con BEL.

Los resultados de la primera inoculación fueron : los conejos inoculados presentaron la enfermedad febril después de 2 días, muriendo algunos; los conejos control no presentaron ningún tipo de enfermedad. En autopsias de los conejos de prueba se presentó un agrandamiento del bazo y áreas esparcidas de consolidación pulmonar, signos no observados en conejos control. Se examinaron los bazos y pulmones de los animales de prueba por inmunofluorescencia directa y fueron positivos para L.pneumophila.

El plasma de los conejos infectados calentado a 56 °C durante 30 minutos mostró actividad hemolítica en dos días de ensayo. El plasma de conejos control y de una muestra obtenida antes de la inoculación de un conejo de prueba, no mostraron hemólisis, mientras que en dos muestras de orina filtrada de conejos de prueba se observó hemólisis franca y en la orina filtrada de un conejo control sólo una zona débil de hemólisis.

En la segunda inoculación se obtuvo lo siguiente: los bazos y pulmones de los animales de prueba fueron negativos por inmuno fluorescencia directa; sin embargo, los pulmones de estos animales mostraron consolidación. Los resultados de la prueba ELISA fueron positivos en la orina de uno de los animales de prueba, en el control fue negativa; la hemólisis en orina calentada deambos tipos de animales fue negativa. Así también el plasma calentado de animales control no presentó hemólisis y el de los conejos de prueba no mostró actividad hemolítica durante una semana de observación, sino hasta después de 15 días.

En la tercera inoculación los bazos y pulmones de todos los conejos de prueba fueron negativos para L.pneumophila por inmuno fluorescencia directa. Los pulmones de los animales mostraron - focos de inflamación dispersos, la orina de los animales control fue negativo para ELISA; cuando se calentó el plasma y la orina de los animales de prueba y control no mostraron actividad hemolítica.

Para confirmar la actividad hemolítica del fluido alantoideo de huevos infectados, se incubaron a 37° C durante 6 días, mostrando resistencia al calor y corroborando lo ya mencionado.

Filtrados de fluido alantoideo sin infectar y de embriones-

mue^{rtos} por frío e incubados a 37° C durante un día , no presen^{ta}ron actividad hemolítica , pero el fluido de dichos huevos in^{cu}bados durante 6 días sí mostró actividad hemolítica y resis^{te}ncia al calor; también se observó actividad en el fluido alant^{oi}deo de un embrión sin infectar que fué conservado en un tubo de centrífuga a la temperatura ambiente, por 7 días.

Los filtrados de fluido alant^{oi}deo de huevos infectados pa^{re}cen tener actividad hemolítica atribuible a la presencia de - L.pneumophila (4); sin embargo, los datos presentados anteriormen^{te} sugieren que el fluido alant^{oi}deo de huevos embrionados, es^{pon}táneamente desarrollan actividad hemolítica en ausencia del contacto con el embrión sano. La presencia de dicha actividad^{en} fluido alant^{oi}deo de embriones infectados con BEL puede sóla^{men}te indicar que la bacteria es patógena para los embriones y^{puede} no reflejar la presencia de hemólisis bacteriana en el ^{fluido}.

Así también los conejos infectados experimentalmente con - L. pneumophila tienen circulando sustancias que lisan eritrocitos de cuyos. Una actividad hemolítica similar, puede también ^{presentarse} en la orina de los conejos, aunque se deben hacer ^{más} observaciones concernientes al plasma de animales inoculados

intravenosamente con fluido alantoideo de huevos infectados, ya que éste puede tener actividad hemolítica intrínseca.

Consecuentemente, los resultados de experimentos con estos modelos deben ser interpretados con precaución pues parece arriesgado afirmar que la actividad hemolítica residual del fluido alantoideo pueda ser detectable varios días después de la dilución en el volumen intravascular de los animales (5).

H. Mueller (124) estudió la acción proteolítica de cuatro cepas de L. pneumophila por el método de inmunolectroforesis, colocando 23 proteínas de suero humano como substratos. Los resultados obtenidos indicaron que esta bacteria degradó cinco de las 23 proteínas del suero que son: ac. -glicoproteína, -antiquimiotripsina, -lipoproteína, -globulina y ₂-glicoproteína-I (ver tabla N° 11). Esta degradación sugiere que dicha bacteria tiene al menos, dos sistemas de diferentes enzimas; la -lipoproteína se degradó con una desviación anódica del precipitado remanente, la -glicoproteína-I lo hizo sin un detectable desvío y la ac. glicoproteína, la -antiquimiotripsina y la -globulina se degradaron con más o menos desvíos catódicos.

Se sospecha que el mecanismo molecular de L. pneumophila puede implicar enzimas proteolíticas, como sugirieron Bayne y colaboradores (4).

TABLA N° 11 Acción proteolítica de L. pneumophila demostrada-
 en proteínas de suero humano por inmunoelectrofore-
 sis (124).

Proteínas probadas	Resultados
1.- Prealbumina	-
2.- Albumina	-
3.- α_1 -Lipoproteína	-
4.- α_1 -Acido glicoproteína	+
5.- α_1 -Antitripsina	-
6.- α_1 - Antiquimiotripsina	+
7.- α_1 - -glicoproteína	-
8.- Inhibidor de la inter - tripsina	-
9.- Haptoglobina	-
10.- Celuloplasmina	-
11.- Gc-globulina	-
12.- α_2 -Macroglobulina	-
13.- α_2 -HS-glicoproteína	-
14.- α_2 -Zn-glicoproteína	-
15.- β -Lipoproteína	+
16.- Transferrina	-
17.- β_{1c} / β_{1A} -Globulina	-
18.- β_{1E} - Globulina	+
19.- Hemopepxina	-
20.- β_2 -Glicoproteína-I	+
21.- Inmunoglobulina A	-
22.- Inmunoglobulina M	-
23.- Inmunoglobulina G	-

1.7 Susceptibilidad a agentes fisicoquímicos:

Viabilidad

Cultivos originales de la bacteria de la enfermedad de los Legionarios recibidos del Center for Disease Control (CDC) permanecieron viables durante 112 días conservados a 25 °C y 147 días conservados a 4°C.

Se han realizado estudios usando las siguientes generaciones de los microorganismos conservados observándose una disminución en la duración de la viabilidad. Ninguna diferencia significativa se notó entre 4 y 25 °C (167), así como también se ha visto que a temperaturas mayores de 42°C no hay desarrollo de la bacteria (51).

Wang y colaboradores (167) investigaron la susceptibilidad de la bacteria a los antisépticos y desinfectantes comúnmente empleados en los hospitales y laboratorios, para descontaminación del ambiente y los sistemas de agua comercial.

Se escogieron los siguientes desinfectantes usados frecuentemente en los hospitales en donde L.pneumophila puede estar presente, la formalina se usa como un fijador y para descontaminar muestras de tejido; iodoformo y cloruro de benzalconio se emplean como desinfectantes quirúrgicos y de piel; el glutaraldehído se

utiliza como un desinfectante para terapia respiratoria y equipo endoscópico; el alcohol, compuestos fenólicos e hipoclorito, se usan en todas partes del hospital, incluyendo los laboratorios.

Existe un amplio rango de concentraciones probadas y sólo los resultados de las concentraciones alrededor de los puntos de susceptibilidad se incluyen en la siguiente tabla.

TABLA Nº 12 Inhibición de la bacteria de la enfermedad de los Legionarios frente a los desinfectantes comunes (167)

AGENTES	CONCENTRACION	CRECIMIENTO							
		1 min		15 min		30 min		60 min	
		5×10^6	10^4	5×10^6	10^4	5×10^6	10^4	5×10^6	10^4
Compuesto fenólico									
2% a 0.001%	0.10%	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.01	+	+	+	+	+	+	-	-
	0.001	+	+	+	+	+	+	+	+
Iodoformo, 10 ppm a 1 ppm									
	10ppm	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	+	+	+	+	+	+	+	+
Compuestos de amonio cuaternario 1:1000 a 1:64000									
	1:8000	-	-	-	-	-	-	-	-
	1:16000	+	+	+	+	+	+	+	+
Glutaraldeido, 2% a 0.008%									
	0.031	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.016	+	+	-	-	-	-	-	-
	0.008	+	+	-	-	-	-	-	-
Hipoclorito, 5ppm a 0.65ppm									
	5.0ppm	-	-	-	-	-	-	-	-
	2.5	+	-	-	-	-	-	-	-
	1.25	+	+	-	-	-	-	-	-
	0.65	+	+	+	+	+	+	+	-
Formalina 2% a 0.05%									
	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.0	-	+	-	-	-	-	-	-
	0.5	-	+	-	+	-	-	-	-
	0.25	-	+	-	+	-	+	-	-

AGENTES	CONCENTRACION	CRECIMIENTO							
		5x10 ⁶	10 ⁴	5x10 ⁶	10 ⁴	5x10 ⁶	10 ⁴	5x10 ⁶	10 ⁴
	0.10	-	+	-	+	-	+		
	0.05	+	+	+	+	+	+		
	0.01	+	+	+	+	+	+		
Alcohol, 70%	70%	-	-	-	-	-	-		
Acido clorhídrico pH 4.0 a 1.4	pH 2.0	+	+	+	+	+	+		
	1.9	+	+	+	+	-	-		
	1.8	+	+	+	-	-	-		
	1.7	-	-	-	-	-	-		

En esta tabla se observa que la exposición de L.pneumophila a una mezcla fenólica al 0.015% durante 1 minuto, mostró una completa inhibición; igualmente 10 ppm de iodoformo y la dilución 1:8000 de un compuesto de amonio cuaternario, fueron efectivos simultáneamente; pruebas a concentraciones más bajas de estos agentes no fueron eficaces a pesar de haber sido expuestos más de 30 minutos. El glutaraldehído a una concentración de 0.031% fue efectivo después de 1 min de exposición y por 15 min a una concentración de 0.008% fue completamente inhibitorio; el hipoclorito a una concentración de 5 ppm requirió solamente 1-min, pero a 0.65 ppm necesitó 60 min. de exposición; la formalina al 2% tuvo una completa inhibición después de 1 min; sin embargo, al 1% requirió 15 min y al 0.5 % necesitó 30 min para ser completamente efectivo.

El alcohol etílico al 70% inhibió completamente a L.pneumophila en 1 minuto; el ácido clorhídrico a pH 2.0 durante 30 minu

tos de exposición no logró inhibirla, pero a pH 1.7 la inhibió completamente.

Los resultados anteriores sugieren que este microorganismo se encuentra entre las bacterias con bajo nivel de resistencia, puesto que las concentraciones para otros microorganismos patógenos están muy por encima de las inhibitorias para esta bacteria; como estos agentes pueden introducirse a sistemas acuosos como tanques de agua, torres de enfriamiento y sistemas de aire acondicionado, se pueden eliminar los reservorios potenciales de L.pneumophila.

Skaly y colaboradores (143) han probado una serie de desinfectantes recomendados para inhibir el crecimiento biológico en torres de enfriamiento y condensadores de evaporación de sistemas de aire acondicionado. Los desinfectantes que probaron son los siguientes: cloro, 2,2dibromo-3nitrilo propionamida, cloruro de dodecil dimetil amino e isopropanol, 5 cloro-2metil-4iso tinazolin-3-1 y 2metil-4 isotiazolin-3-1, etileno disódico bis (tiocarbamato) más dimetil diocarbamato sódico y un pentaclorofenato más sales de sodio de otros cloro fenoles. La acción bactericida más efectiva se observó con concentraciones de hipoclorito de calcio que proporciona 3.3 y 6.6 g de cloro libre por ml; un total de 1.3×10^6 células viables por ml fueron-

rápidamente inactivadas, ya que ninguna célula se recuperó del medio de cultivo o en embriones de pollo después de la exposición durante tres, seis y veinticuatro horas.

La combinación de cloruro de dodecil dimetil amonio e isopropanol fué también altamente efectiva a las concentraciones de $72.0 \mu\text{g/ml}$ y $144.0 \mu\text{g/ml}$.

La acción letal del 2,2 dibromo-3-nitrilo propionamida no fué tan rápida como se observó con el hipoclorito de calcio o con la combinación del alcohol cuaternario, ya que al tiempo cero se recuperaron células viables tanto del medio artificial como de embriones de pollo; después de la exposición de 3 y 6 h, relativamente pocas células sobrevivieron a las concentraciones de 6.0 y $12 \mu\text{g/ml}$ y ninguna se recuperó a la concentración de $24.0 \mu\text{g/ml}$.

La inhibición con el desinfectante compuesto por 5-cloro-2 metil-4-isotiazolin-3-1 y 2 metil-4-isotiazolin-3-1 a las concentraciones de 60.0 y $120 \mu\text{g/ml}$ después de 168 h de exposición, resultó efectivo, ya que no se encontró ninguna célula viable en medio artificial y embriones de pollo. Con el desinfectante compuesto por etileno disódico bis(tiocarbamato) y dimetil ditio carbamato sódico después de 168 horas de exposición, se recupera

ron células viables en embriones de pollo a las siguientes concentraciones de 20, 40 y 100 μ g/ml. El desinfectante compuesto por penta clorofenato y sales de sodio de otros clorofenoles, a las 168 horas de exposición a la concentración de 71.0 μ g/ml no proporcionó células viables sobre medios de cultivo ni en embriones de pollo.

De los desinfectantes probados, las formulaciones que contenían hipoclorito de sodio o cloruro de dodecil amonio e isopropanol presentaron una acción bactericida satisfactoria contra L.pneumophila en agua, aunque el 2,2 dibromo- nitrilo propionamida no actuó tan rápido como los anteriores; pero el hecho de que después de 6 horas de exposición no se recuperaron células viables, sugiere que este compuesto puede también destruir al microorganismo en agua dentro de un período razonable de tratamiento. Los dos últimos desinfectantes parecen ser de uso limitado a epidemias asociadas con agua contaminada en sistemas de aire acondicionado.

Con los resultados obtenidos de este estudio, se observa la relativa toxicidad de los desinfectantes disponibles que se recomiendan comercialmente para el control de hongos, bacterias y algas en agua de torres de enfriamiento y condensadores de eva_

poración. Es conveniente tomar en cuenta diversas condiciones físicas, químicas y biológicas que pueden existir en el funcionamiento de los sistemas de aire acondicionado que afecten marcadamente la acción bactericida de ellos, condiciones que no se incluyeron en este estudio.

Producción de β lactamasa.

Se ha establecido la actividad de lactamasa en todos los serogrupos de L.pneumophila. Esta enzima fué detectada en células intactas lisadas por tratamiento del ácido etilendiamino tetracético, indicando que se localiza en el espacio periplásmico (96).

Se utilizaron varios antibióticos lactámicos y se llegó a la conclusión de que la enzima actúa principalmente como una cefalosporinasa hidrolizando el cefamandol, la cefalotina, la cefaloridina y también la penicilina G y la ampicilina; el cefoxitin y cefuroxina no son hidrolizados. Se usaron dos inhibidores de lactamasa sobre la actividad hidrolítica de extractos de L. pneumophila; ellos son el ácido clavulánico y CP45,899, un ácido penicilínico sulfónico, que han sido efectivos inhibidores de ciertos tipos de lactamasa.

El CP45,899 inhibió la hidrólisis de la ampicilina por la bacteria, en un 35 a 40 % y en un 60 % en la penicilina; con el cefamandol se produce casi una completa inhibición. El ácido clavulánico inhibió parcialmente el cefamandol.

La enzima no se ajusta al carácter de los demás plásmidos descritos o cromosómicamente mediados por lactamasa; se presen

ta primeramente como una cefalosporinasa por la destrucción del cefamandol, pero no de cefuroxina; se piensa que la enzima es similar a la establecida en Citrobacter y Enterobacter. Así también se cree que la lactamasa de esta bacteria pertenece a una nueva clase ya que su actividad es diferente de la establecida en las familias Enterobacteriaceae y Pseudomonadaceae (96).

Knuson y Mikesell (95) lograron aislar dos plásmidos en 16 cepas de L. pneumophila, que incluyen los seis serogrupos.

El ADN extracromosomal se aisló de dos cepas, la Atlanta 1- y la Atlanta 2, por medio de un lisado optimizado y un procedimiento de purificación de plásmidos. Valiéndose del peso molecular conocido del plásmido de la cepa E.coli US17, se lograron obtener los pesos moleculares de los plásmidos PKM69 aislado de la cepa Atlanta 1 y el PKM70 aislado de la cepa Atlanta 2, con un peso molecular promedio para los dos de 30 megadaltons.

2.- PATOLOGIA

2.1 Definición de la enfermedad de los Legionarios

Es una enfermedad aguda del tracto respiratorio inferior- que incluye en su sintomatología fiebre, dolor de cabeza, esca-
lofríos, mialgias, debilidad, dolor de pecho y tos que se acom-
pañan de síntomas gastrointestinales y neurológicos y fallo -
hepático y renal. Es causada por un bacilo denominado L.pneumo
phila , Gram-negativo, de difícil aislamiento en medios ordina-
rios, por lo que hay necesidad de inoculación a animales y pos-
terior cultivo en huevos embrionados (55,57,104,155,166).

2.2 Cuadro clínico

Al haberse realizado investigaciones epidémicas y estudios de laboratorio de casos esporádicos confirmados, se tuvo como resultado un cuadro de manifestaciones y aunque los rasgos clí-
nicos no son suficientemente claros para distinguir la enferme-
dad de los Legionarios de otros tipos de neumonía aguda, se ha
logrado establecer un perfil para detectarla.

El período de incubación es de 2 a 10 días; sin embargo, se han presentado casos entre 16 y 26 días. La Fiebre de Pontiac, que es una modalidad de Legionelosis y se presenta en 12 a 72 horas (57,151).

Signos y síntomas

La enfermedad generalmente comienza con malestar, anorexia mialgias difusas, debilidad y dolor de cabeza, observándose - durante las siguientes 12 a 48 horas, el súbito ataque de fiebre alta con un promedio de 39.5°C (del rango de 38.2°C a 40.7°C) asociada con escalofríos, tos no productiva y severa postración; éstos se ven modificados según el paciente.

Los síntomas gastrointestinales se manifiestan como náuseas vómitos, diarrea acuosa (sin sangre, con mucosidad o asociada a dolor abdominal) que pueden aparecer en fase temprana de la enfermedad. En el examen físico inicial se escuchan estertores secos en el 80% de los pacientes; también se observa taquicardias, mas no existe coriza ni dolor de garganta.

Durante el primer y segundo día de la enfermedad se presentan rigor y bradicardia relativa. En el segundo y tercer día, - una tos seca comienza a producir pequeñas cantidades de esputo ligeramente purulento o no purulento. El 20 a 40% de los - pacientes manifiestan hemoptisis; de 30 a 40%, dolores de pecho generalmente de naturaleza pleurítica y en algunos enfermos se presentan disnea y taquipnea, como una implicación pulmonar (ver la tabla N° 13).

Algunos pacientes, inclusive, sufren cambios en su estado mental que incluyen: somnolencia, obnubilación, confusión, delirio, letargia, desorientación visual; otros presentan, además, alucinaciones visuales, afasia, ataxia, debilidad en manos y miembros inferiores; sin embargo el análisis químico del fluido cerebro espinal (proteínas, células y glucosa, etc) de estos pacientes, es normal. Estos síntomas no se describen en la epidemia de Philadelphia, pero sí se han presentado en otras epidemias y en casos esporádicos. El pulso de los pacientes fue en promedio, arriba de 110/ min y la velocidad de respiración, en promedio, fue mayor de 30/min (9, 15, 57, 69, 81, 88, 89, 91, 98 100, 116, 117, 137, 138, 153, 162).

TABLA N° 13 Resumen de síntomas en 123 casos de enfermedad de los Legionarios en Pennsylvania, julio-agosto de 1976 (162).

SINTOMAS	INICIALMENTE	TOTAL		AUSENCIA
	SE PRESENTA	PRESENCIA		
	N°	N°	%	N°
Fiebre	91	118	97	3
Malestar	60	86	89	11
Tos	61	96	86	16
escalofríos	55	70	74	25
Disnea	26	50	59	35
Mialgias	39	47	55	38
Dolor de cabeza	35	49	53	44
Dolor de pecho	23	46	52	42
Producción de esputo	20	47	50	47
Esputo purulento	11	23	49	24
Diarrea	16	41	41	58
Vómitos	10	22	23	72
Dolor abdominal	6	17	20	67

Los síntomas de neumonía fueron confirmados por radiografías del pecho; éstas mostraron anormalidades debidas a infiltrados localizados, implicando una consolidación. Los infiltrados bilaterales se presentaron en casi una cuarta parte de los pacientes, notándose en algunos pequeñas efusiones pleurales que no son comunes en todos los demás casos de la enfermedad de los Legionarios.

Con el avance de la enfermedad, la mayoría de los pacientes desarrollaron infiltrados bilaterales y áreas confluentes de consolidación, involucrando muchos lóbulos; al progreso de la neumonía aumenta el dolor respiratorio y la hipoxia, necesitando terapia de oxígeno y asistencia de mecanismos de ventilación. La cavitación pulmonar no se había observado en radiografías de pacientes de las epidemias de Philadelphia, Vermont y los Angeles o en los casos esporádicos, pero últimamente sí se ha reportado presencia de cavitación en enfermos de Legionelosis comprobada.

En muestras de tejido obtenidas de los pacientes de las epidemias de Philadelphia y Vermont, se estableció en 35 casos una neumonía aguda fibrinopurulenta y en 20, un difuso daño alveolar.

La neumonía aguda fibrinopurulenta se caracterizó por la presencia de un denso infiltrado intraalveolar de neutrófilos, generalmente acompañado por gran número de macrófagos, fibrina, despojos de proteínas y un frecuente número de eritrocitos. Se observó también necrosis o lisis de las células inflamatorias, así como la septa alveolar severamente aumentada debido a la extenso fibrosis intersticial.

Por tinciones realizadas en el tejido, se pudo observar a L. pneumophila dentro de neutrófilos y macrófagos y también extracelularmente, siendo más numerosos en donde el exudado estaba lisado (9, 13, 15, 22, 43, 55, 58, 59, 67, 81, 88, 91, 100, 116, 138, 162, 177).

Reportes de laboratorio muestran moderada leucocitosis (- 10,000 a 20,000 leucocitos / mm^3); la velocidad de sedimentación eritrocítica fue mayor de 70mm, el fibrinógeno y división de productos de fibrina fue normal, aunque el tiempo parcial de protombina y tromboplastina aumentó.

Muestras de sangre inicial presentan hipocapnea y alcalosis respiratoria, con una presión arterial de CO_2 (PCO_2) promedio \leq 30 mm de Hg y una presión arterial de oxígeno (PO_2), igual a \leq 50 mm de Hg.

La insuficiencia o falla renal que se presenta en algunos pacientes, se observa por la evaluación de nitrógeno de urea en el suero y concentración de creatinina sin oliguria; cuando existe falla renal franca con oliguria o anuria, se necesita tratamiento de diálisis.

Se presentó proteinuria, cilindruria y hematuria, tanto en los pacientes que acusaban falla renal como en los casos que su función renal era normal; se observa también hipofosfatemia (≤ 2.5 mg/dl) e hiponatremia (≤ 130 mg/dl), durante las 72 primeras horas de la enfermedad.

Se ve definida una evidencia química de daño hepático, por la elevación de las transaminasas glutámico oxalacética y glutámico fenil pirúvica, de la fosfatasa alcalina, de la deshidrogenasa láctica y bilirrubina. En algunos pacientes ocurrió hiperbilirrubinemia con ictericia.

La elevación de estas enzimas se resuelve espontáneamente con la terapia antimicrobiana, sin que ningún paciente desarrolle lesión hepática (15, 55, 57, 58, 69, 72, 81, 88, 89, 91, 98, 100, 117, 137, 138, 153, 162).

Con lo anterior se han logrado establecer algunas diferencias entre la enfermedad de los Legionarios y las otras neumonías.

nías (ver tabla N° 14).

tabla N°14 Características clínicas, de laboratorio y radio -
gráficas de la enfermedad de los Legionarios, compa-
radas con otras neumonías (81).

PRESENTACION DE SINTOMAS	NEUMONIA NEUMOCOCCICA	ENFERMEDAD DE LOS LEGIONARIOS	NEUMONIA MICOPLASMAL
Media de duración de síntomas antes de la presentación + SEM (rango) d	2.9+0.4(1-6) ---*---	4.6+0.4(3-7)---*---	12.6+1.4(3-22)
Síntomas respiratorios superiores	12/23 ----*----	0/14 ----*----	8/20
Tos	19/23	7/14 ----*----	20/20
Nausea-vómito-diarrea	7/23	8/14	8/20
Diarrea	1/23	3/14	2/20
PRESENTACION DE SINTOMAS			
Temperatura -38.2°C	18/23	12/13 ----*----	7/20
Media de temp.+SEM (rango) °C	38.8+0.2(37.2-40.3)-*---	39.2+0.3(37.8-40.7)-*---	38.2+0.2(37-40.4)
Confusión sin explicación, delirio, estupor	0/21 (0/21t)*---	4/14(7/14t)--*--	0/20(0/20t)
DATOS DE LABORATORIO			
Cuenta de leucocitos +SEM(rango), 10 ³ /mm ³	13.1+1.2(3.6-24.7)	13.4+1.3(1.3-18.2)	11.4+1.9(2.8-29.0)
Proteinuria sin explicación	8/20	9/12 ----*----	4/17
Hematuria	2/20 ----*----	6/12 ----*----	0/17
PRUEBAS QUIMICAS DEL SUERO			
Creatinina -2.0mg/dL	3/23	0/10	1/17
SGOT** 40 IU/L	6/20 ----*----	9/10 ----*----	6/17
Albumina 3.2g/dL	3/20 ----*----	5/8	3/16
Media SGOT+SEM(normal 40), IU/L	37+5 ----*----	112+40	39+6
Media albumina+SEM(normal, 3.5-5.0)g/dL	3.70.1 ---*---	2.9+0.2	3.5+0.1
RADIOGRAFIAS DE PECHO			
Presentación de infiltrados			
Un solo lóbulo	18/23	11/14	12/20
Múltiples lóbulos	5/23	3/14	7/20
Bilateral	4/23	3/14	7/20
Efusiones	2/23	3/14	4/20
Progresión para involucrar otros lóbulos	2/23 ----*----	6/14 ----*----	0/20
d P 0.05 por la prueba de Wilcoxon rank-sum o la Fisher's			
t Prevalencia de todos durante el curso de la enfermedad			
** SGOT Transaminasa Glutámica-oxalacético			

Miller y colaboradores (117) realizaron una breve diferenciación clínica de la enfermedad de los Legionarios con las otras neumonías, tomando en cuenta algunas condiciones que se mencionan más adelante. La presencia de cuando menos tres de ellas durante las primeras 24 horas de hospitalización fundamentan casi con seguridad la existencia de Legionelosis en el paciente.

- 1.- Síntomas prodrómicos con fiebre mínima de 39°C durante los cuatro días anteriores a la admisión.
- 2.- Confusión mental, o diarrea, o tos no productiva, o una combinación de éstas.
- 3.- Linfopenia menor a $1,000/\text{mm}^3$, cuando la cuenta total de leucositos sea menor a $15,000/\text{mm}^3$.
- 4.- Que presente hiponatremia menor de $130\text{mg}/\text{dL}$.

UN 71% de los pacientes con Legionelosis muestran tres de estos cuatro puntos; en contraste, ningún paciente con otro tipo de neumonía mostró más de dos.

Del segundo al cuarto día sólo se aplican los siguientes criterios si los cultivos de sangre son estériles y no hay patógeno oportunista aislado del esputo. La presencia de alguno de los siguientes es altamente sugestivo de la existencia

cia de dicha enfermedad.

1.- Avance de consolidación pulmonar, a pesar de la presencia de terapia antimicrobiana.

2.- Resultados de función anormal del hígado, en ausencia de enfermedad hepática conocida y elevación del nivel de bilirrubina o transaminasas más de dos veces del límite superior normal.

3.- Hipoalbuminemia menor a 25 g/l.

Estas características adicionales pueden ayudar al diagnóstico en el período tardío de la enfermedad. Ninguno de los pacientes con otras neumonías presentan alguno de los tres criterios anteriores.

2.3 Epidemiología

Habitat

Sobre el habitat natural de L.pneumophila no se sabe mucho, pero se piensa que se encuentra en toda la naturaleza (121,178).

Muchos agentes infecciosos que provocan epidemias de neumonía que no se propagan de persona a persona, lo hacen a través del aire a partir de un nicho ecológico característico y de un medio ambiente no humano. Un ejemplo común es el hongo Hystoplasma capsulatum, que vive en el suelo y provoca la enfermedad cuando se inhala el polvillo que éste contamina. Parece así probable, que L. pneumophila se desarrolla en un ambiente inorgánico. Esta hipótesis fué confirmada por Peter Skaly y colaboradores (142), quienes mostraron que la bacteria podía sobre vivir, aunque aparentemente sin proliferar, durante más de un año en agua potable.

Un brote localizado en el hospital Sta Isabel, en Washington, sugirió que L.pneumophila podía vivir en la tierra, ya que en aquel verano, se había excavado el terreno en varios puntos para la instalación de riego del césped.

En 1977 S.D. Tracker y colaboradores (155) encontraron que eran principalmente los pacientes cuyas camas se hallaban pró-

ximas a las ventanas en los edificios cercanos a una excavación, quienes contrajeron la enfermedad. Los casos se presentaban - cinco o seis días después de cada excavación, lo que sugirió - que el polvo contaminado que se levantaba en el proceso se había propagado hasta infectar a los enfermos a través del aire; en - 1965 no se pensó buscar al agente infeccioso en el suelo. Posteriormente, en Bloomington aislaron al microorganismo de lodo y arena del fondo de un arroyo (121).

En cuatro brotes registrados (Pontiac, Bloomington, Memphis y Atlanta) se encuentran implicados como fuente de infección, - el agua de las torres de refrigeración y los condensadores de - evaporación del sistema de aire acondicionado (45, 57, 74). El agua en una torre de refrigeración se pulveriza sobre varillas de madera o de otro material; a medida que el aire pasa por el ventilador, las gotitas caen. Parte del agua se evapora, enfrián dose el resto que pasa a reciclarse. Una pequeña cantidad de - agua es arrastrada en el chorro de la corriente en forma de va por o de diminutas gotas con el aire consumido; la corriente - arrastra con todo lo que hay en el agua de la torre de refrige- ración, incluyendo bacterias presentes y lo transporta hasta una considerable distancia. En un condensador de evaporación el

agua se pulveriza sobre espirales metálicas que contiene el refrigerante. Este dispositivo se enfría directamente por efecto de la evaporación del agua.

En los anteriores brotes se comprobó que los enfermos habían sido expuestos a estas corrientes de aire (45,57,119,136). Hasta la fecha, no se sabe cómo estos componentes del sistema de aire acondicionado se han contaminado con L.pneumophila (159).

En 1983 se encontró a dicha bacteria contaminando el agua de un humidificador que funcionaba en un cuarto de incubación-microbiológica en un hospital, sin causar daño al personal del laboratorio o a algún paciente.

La fuente del agua del humidificador fue el sistema de agua potable y los microorganismos de este fluido fueron de origen natural; Zuravleff y colaboradores (183) determinaron si la aerosolización de la bacteria de este humidificador puede desarrollar infección a cobayos..La exposición de medios de cultivo y de cobayos, a los aerosoles producidos por L.pneumophila les ocasionó una enfermedad subclínica que se demostró por seroconversión, mostrando así que la creación mecánica de aerosoles de agua potable contaminada por Legionella, puede ser un vehículo de transmisión de Legionelosis, especialmente si se trata de un

hospital.

Distribución

A pocos años de haberse conocido la enfermedad de los Legionarios, se han descubierto casos prácticamente donde quiera que se ha buscado, como en más de 40 estados de la Unión Americana, Australia, Canadá, Dinamarca, Grecia, Israel, Italia, Holanda, Noruega, España, Suecia, Suiza, Alemania Federal e Inglaterra. No se ha encontrado un patrón geográfico, puesto que la información procedente de muchas zonas es aún escasa e incompleta. A veces existen casos que parecen tener un origen común y en ocasiones se presentan aislados, sin antecedente de propagación de persona a persona. Por estudios epidemiológicos que se han realizado, se ve que la infección debida a L.pneumophila es más frecuente en el verano y comienzo del otoño, entre los meses de junio a noviembre, y disminuye su frecuencia en invierno (29,57, 78,132).

Se ha observado que los casos esporádicos se encuentran sobre todo entre viajeros, trabajadores de la construcción y personas que viven cerca de excavaciones o construcciones y las epidemias de grupo se han presentado, por lo general, en personas que han permanecido dentro o cerca de un edificio contaminado, frecuentemente un hotel o un hospital; en algunas ocasiones

el edificio parece haber sido sencillamente un lugar al que ha-
concurrido gran número de individuos susceptibles; pero en otras,
el sistema de aire acondicionado central estaba involucrado en-
la dispersión de la bacteria (7,57,70,108,149).

Epidemias y casos esporádicos reportados.

Washington (1965)

La primera epidemia ocurrida en julio y agosto de 1965 en -
el hospital St. Elizabeth en Washington, se presentó como una -
severa enfermedad respiratoria caracterizada por un ataque de -
fiebre alta, dolor de cabeza, malestar y tos no productiva, sín-
tomas frecuentemente acompañados por evidencia radiográfica de
neumonía. Se pensó inicialmente que se debía a la presen-
cia de Klebsiella pneumoniae, pero sólo fué cierto en unos cuan-
tos pacientes. En 1977 esta epidemia, aún sin resolver, se re-
lacionó a la enfermedad de los Legionarios después de pruebas -
serológicas realizadas en sueros almacenados en el Center for -
Disease Control (CDC). También tuvo interés el hecho de que --
hubo grandes excavaciones de tierra sobre el campo del hospital
durante el verano para instalar un sistema de riego. Se estu-
diaron diferentes factores de riesgo para contraer la enferme-
dad incluyendo los pacientes con ventanas abiertas y los que te

nían acceso libre a los jardines del hospital. De este modo, - las lluvias y los sitios geográficos de las excavaciones se asociaron con el aumento en el riesgo de la enfermedad. Esta evidencia sugiere la propagación por el aire, del reservorio del medio ambiente, por alguna ruta relacionada con los sitios de excavación (45,57,75 ,137,155).

Pontiac, Michigan (1968)

En julio de 1968 una severa epidemia de una enfermedad febril aguda , posteriormente confirmada por medios serológicos, - ocurrió en el edificio del Departamento de Salud de la región de Pontiac, Michigan; se determinó que era por un agente similar o idéntico a la bacteria L.pneumophila. La enfermedad que se presentó fué benigna ya que sólo incluyó fiebre, malestar, mialgias, escalofrío y dolor de cabeza; los síntomas del tracto respiratorio, aunque se presentaron en algunos pacientes, no representaron la parte importante de la enfermedad que se llegó a conocer como " Fiebre de Pontiac".

En estudios realizados se encontró implicado el sistema de aire acondicionado del edificio observándose que el escape del aire del condensador de evaporación, ingresó a la circulación - junto con el aire acondicionado en conductos que lo suministra-

ban al edificio; cuando esto se detectó y arregló no ocurrió - ningún caso adicional. En otros estudios, la bacteria se aisló de cobayos expuestos al aire en el interior del edificio y del agua procedente del condensador de evaporación.

El descubrimiento de la Fiebre de Pontiac que se considera una variante del cuadro clínico presentado en la Legionelosis, así como el hecho de identificar el sistema de aire acondicionado como la fuente y mecanismo de propagación del agente etiológico, fueron muy importantes para el conocimiento de dicha bacteria (14,45,55,137).

Benidorn, España (1973).

En el verano de 1973, una tercera epidemia de la enfermedad de los Legionarios ocurrió entre miembros de un grupo escocés que realizaron un viaje a Benirdorm, España, observándose que todos los que se hospedaban en un mismo hotel presentaron una enfermedad respiratoria, que no existió en otros miembros que se alojaron en un hotel diferente. Fue hasta después de la epidemia de Philadelphia, que por pruebas serológicas se comprobó la presencia de la bacteria en muestras de tres pacientes muertos y en sueros de dos pacientes sobrevivientes, además de haberse observado títulos elevados en empleados del mismo hotel.

No se conocen detalles adicionales de la epidemia pero se plantea nuevamente su existencia en un edificio particular (45,70, 137).

Holanda (1973-1978)

En pruebas serológicas realizadas en 24 pacientes con severa neumonía no explicada, etiologicamente se encontró en 15 de ellos la presencia de anticuerpos contra L.pneumophila. Todos los casos fueron esporádicos; ocho adquirieron la enfermedad en el extranjero y siete en Holanda (116).

Convención de los Legionarios, Philadelphia (1976).

La epidemia de los Legionarios que ocurrió durante la convención de la Legión Americana, entre el 25 de julio y 3 de agosto de 1976 en Philadelphia, en el hotel Bellevue-Stratford, atacó a ciento ochenta y dos personas, causándole la muerte a 29 de ellos. Investigaciones posteriores mostraron como sitio evidente de transmisión, la oficina central del hotel y particularmente el loby; no hubo asociación de la enfermedad con las comidas, bebidas alcohólicas, tabacos, consumo de agua, contacto con pájaros, mamíferos, picaduras de insectos o sitios alrededor de el hotel; no se encontró propagación alguna de persona a persona.

Se estableció evidencia serológica de contacto con L.pneu-

mophila entre algunos empleados que habían trabajado más de dos años, sugiriendo ésto que el agente pudo haber estado presente, o tal vez intermitente por dos días o más años. Sin embargo, - las investigaciones epidemiológicas sugieren fuertemente la pro- pagación de la bacteria por el aire llevado al área del loby - del hotel (45,57,105,137).

Gran Bretaña (1976-1978)

En Gran Bretaña se detectaron 84 casos esporádicos que inclu- yen 18 pacientes que murieron entre el primero de enero de 1976 y el 30 de septiembre de 1978; predominaron en estos casos per- sonas del sexo masculino de edad madura. No se detectó ninguna fuente de infección y se cree que la incidencia se debió al cam- bio de estación; no se observó propagación de persona a persona y se sugiere que la fuente de infección fue el medio ambiente(7).

Burlington, Vermont y Hospital Wadsworth (1977).

Las epidemias reportadas en el Medical Center de Burlington, Vermont y en el Hospital Wadsworth Veterans Administración de - los Angeles, presentan ambas, evidencia de una adquisición intra- hospitalaria. Se observó que L.pneumophila existió como- una bacteria oportunista, ya que en las dos epidemias atacó - fuertemente a personas inmunocomprometidas o con alguna enferme

dad crónica, causando un gran porcentaje de mortalidad. En estas dos ocasiones no se aisló de ninguna fuente al microorganismo, pero se cree que también se propagó por medio del aire, en sus alrededores. A finales del año se aisló la bacteria de una muestra de agua obtenida de una torre de enfriamiento de dicho hospital (108).

Nottingham, Inglaterra (1977).

Durante los meses de agosto a septiembre de 1977, se identificó la enfermedad de los Legionarios como causa de una severa neumonía en algunos pacientes de la ciudad de Nottingham, Inglaterra; no se encontró fuente de infección entre ellos y solamente unos habían viajado al exterior antes de contraer el padecimiento; no se observó propagación secundaria a miembros de la familia ni a empleados en el hospital donde fue detectado (105, 106).

Kingsport, Tennessee (1977).

Entre los meses de agosto y septiembre se mencionó una epidemia de Legionelosis entre visitantes, residentes y trabajadores de una área limitada de Kingsport; se confirmaron 27 casos, 26 serológicamente y uno en tejido de pulmón, post mortem.

La epidemia no tuvo correlación con algún evento, tampoco-

se encontró alguna fuente del medio ambiente, ni se observó =
propagación de persona a persona(34).

Columbus , Ohio (1977)

A fines de agosto, tres pacientes de un hospital de la comunidad de Columbus, Ohio, contrajeron la enfermedad de los Legionarios; se cree que se adquirió en el hospital o en sus alrededores. A fines del año se aisló la bacteria de una muestra de agua obtenida de una torre de enfriamiento de dicho hospital (108).

Bloomington, Indiana (1978).

Treinta y nueve casos de Legionelosis se identificaron en visitantes y residentes que asistían a un curso en Bloomington, Indiana y que permanecieron por lo menos una noche o pocos días (entre 2 y 10) en el Indiana Memorial Union, antes de contraer la enfermedad.

La bacteria se aisló de una torre de enfriamiento del aire acondicionado del edificio de la Unión, pero esta implicación del sistema de aire puede no ser la única vía de propagación, ya que también se aisló del lodo de un arroyo y del barro cercano al Memorial Union (45,121,129).

Hospital Baptis, Memphis, Tennessee (1978).

Durante los meses de agosto a septiembre de 1978 una epidemia de enfermedad de los Legionarios ocurrió en Memphis, Tennessee, entre pacientes y empleados del hospital Baptist. Las investigaciones realizadas revelaron como fuente del agente causal, una torre de enfriamiento del sistema de aire acondicionado, que era una torre auxiliar que no había sido usada durante dos años, pero que tuvo que utilizarse como emergencia por una inundación que sufrió el cuarto de máquinas del hospital y que había perjudicado a la que se hallaba en servicio. Así, nuevamente se observa que el organismo se propaga por el sistema de aire acondicionado (35,45).

Club Country, Atlanta (1978)

En julio de 1978 ocurrió una epidemia entre jugadores de golf de un club de la ciudad de Atlanta, Georgia; se cree que la salida del condensador de evaporación del sistema de aire acondicionado del club hacia el campo de golf, llevó al microorganismo, corroborando esto con el aislamiento de la bacteria del condensador de evaporación (45).

Condiciones predisponentes.

Por lo general, la enfermedad de los Legionarios ocurre en la madurez, se presenta dentro de un rango de edad que va de 10

meses a 84 años con una edad promedio de 54 años para el hombre y 56 años para la mujer (7,74,132,149); se ha visto que predomina en el sexo masculino en una proporción de 3 a 1. Se ha diagnosticado sólo una vez en un niño. Anderson y colaboradores (10) realizaron un estudio en Denver, Colorado en 54 niños que presentaban enfermedad respiratoria aguda y se observó por evidencia serológica, que ninguno de los casos se debía a L. pneumophila; sin embargo, el examen de muestras de sueros de estos niños, al año de la enfermedad respiratoria, mostraron un aumento en su título, sugiriendo esto que los niños se encuentran frecuentemente expuestos a la bacteria (35).

Los pacientes que presentan mayor susceptibilidad para desarrollar la enfermedad son los inmunocomprometidos, en los cuales se observa también mayor índice de mortalidad. Se vio, tanto en el Hospital Veterans Administration Wadsworth de los Angeles, como en la epidemia de Vermont y en algunos otros casos esporádicos, que los pacientes que habían contraído esta enfermedad eran sujetos sometidos a terapia inmunosupresora y de corticosteroides. Todos ellos padecían enfermedades básicas como: diabetes mellitus, alcoholismo, enfermedad pulmonar crónica, asma, homografía renal, vasculitis, hipertensión, glomerulonefri-

tis , cardiomiopatía:ideopática, edema laríngeo, linfoma, cancer, falla renal crónica, arteriosclerosis vascular, úlcera péptica, mieloma múltiple, leucemia, y pacientes con transplantes (ver la siguiente tabla).

TABLA N° 15 Condiciones asociadas en 56 pacientes, quienes contrajeron la enfermedad de los Legionarios (9).

	N° de pacientes*	N° de Inmuno comprometidos
Cancer		
Tumores sólidos	10	10
Desórdenes mieloproliferativos	6	6
Arteriosclerosis vascular	14	-
Enfermedad valvular del corazón	2	-
Enfermedad renal		
Receptores de hemodiálisis	-	2
Receptores de transplante y diálisis	-	2
Diabetes Mellitus	10	-
Hipertensión	8	-
Artritis, toma de esteroides	1	1
Inflamación del intestino, toma de esteroides	2	2
Alcoholismo	6	-
Embarazo	1	-
Enf. obstructiva crónica del pulmón	4	-
Fumadores de cigarro °	30	-
* Algunos pacientes presentaron más de una condición asociada		
° No se considera enfermedad cronica.		

Los fumadores tienen también gran predisposición para contraer la enfermedad, lo que no es sorprendente, pues generalmente poseen más riesgo para desarrollar infecciones pulmonares de cualquier etiología (7,9,20,29,57,73,139,149,173).

2.4 Inmunología.

La respuesta inmune frente a L. pneumophila se ha mostrado serológicamente, y sobre la reactividad inmune celular en pacientes con dicha enfermedad se conoce muy poco aún. La respuesta inmune es una conversión serológica positiva basada en el resultado de técnicas de inmunofluorescencia indirecta, del análisis de inmunofluorescencia directa de tejido de pulmón infectado, - hemaglutinación, microaglutinación, Elisa y otras técnicas.

La secuencia de formación de anticuerpos después de la enfermedad no se ha estudiado extensivamente debido, en parte, a una falta de secuencialidad de muestras coleccionadas, pero también a la escasez de sueros de casos confirmados.

Mc Kinney y colaboradores (113) realizaron un estudio para ver la formación de anticuerpos en dos casos:

Caso N°1.- Mujer de 30 años con diálisis crónica renal, internada en el hospital para un trasplante renal; presentó los síntomas característicos de Legionelosis que fué confirmada por tinción de inmunofluorescencia directa de biopsia de pulmón y posteriormente se aisló a L. pneumophila en agar Hinton- Mueller-Isovitalex-hemoglobina.

Caso N°2.- Hombre de 44 años con una falla crónica renal y piel

nefritis crónica; presentó los síntomas de Legionelosis, confir- mándose posteriormente por cultivo y por inmunofluorescencia di- recta de improntas de biopsia de pulmón.

En el caso N° 1 de este estudio se obtuvo a los 14 días del ataque de la enfermedad el título máximo de IgG, IgM, e IgA en - respuesta a antígenos comunes de L.pneumophila ; a los 22 días se obtuvo un título con el serogrupo 6 específico de IgG, IgM e IgA. En cinco semanas el título de IgA fué más bajo del nivel- diagnóstico, en contraste con los títulos específicos de IgG e IgM que declinaron lentamente a 256 y 128 respectivamente a través- de los siguientes 8 meses.

En el otro caso también hubo presencia de antígenos comunes representados en las tres clases de inmunoglobulinas, trece días después del ataque de la enfermedad, la respuesta de IgG e IgA- fue más alta que a las cinco semanas, en comparación del caso - N° 1 ya que en el mismo tiempo la IgA ya había declinado. Se - observe en ambos casos que en el período entre la tercera y quin- ta semana se obtiene la máxima síntesis de anticuerpos.

Lattimer y colaboradores (99), dos años después de la epide- mia de Philadelphia, realizaron un estudio en personas que se - recuperaron de la enfermedad, en otras expuestas sin presentar-

el cuadro y en sujetos control.

Se observó que el 94% de personas que habían sobrevivido - tenían niveles significativos de anticuerpos IgG e IgM en comparación con aquéllos que habían sido expuestos (53%) sin presentar la enfermedad. La persistencia de anticuerpos IgM aumentó la sospecha de latencia o infección subclínica como parte de la historia natural de la enfermedad de los Legionarios.

Los hallazgos de anticuerpos IgM dos años después de la enfermedad llamó mucho la atención por las siguientes razones:

- Primera. El aumento de IgM en el diagnóstico específico por inmunofluorescencia indirecta; fue anotado por Ormsbee y colaboradores (128) quienes reportaron el aumento de anticuerpo IgG - contra L.pneumophila y Chlamydia psittaci (cepa 6 BC), en muestras de pacientes con Legionelosis; también algunos cobayos - infectados con BEL desarrollaron anticuerpos IgG contra dicha - bacteria y C. psittaci ; ahora bien, la presencia de anticuerpos IgM frente a la bacteria de la enfermedad de los Legionarios pero no frente a C.psittaci señala claramente la diferencia entre los antígenos.

-Segunda. La presencia de anticuerpos IgM que se establece durante la infección aguda y por corto tiempo después de la convale-

cencia frente a un antígeno bacteriano, se asocia con frecuencia a una infección latente o continua y es una secuela común de algunos virus, clamidias e infecciones por bacterias intracelulares.

La persistencia de anticuerpos IgM, la presencia de una enfermedad crónica y la localización intracelular de L.pneumophila en pacientes de la epidemia de Philadelphia, sugiere que puede ocurrir la infección latente. Esto puede tener conexión con los casos de Legionelosis descrita en huéspedes inmunocomprometidos.

Se han realizado varios estudios para ver la prevalencia de anticuerpos en varias especies de animales (30,44,73,79,150). Como resultado de ellos se han encontrado títulos positivos - más altos en suero equino (31.4%) que en el ganado vacuno (5.1%), en cerdos (2.9%), en carneros (1.9%), en perros (1.9%), en cabras (0.5); en animales de vida salvaje (0%) y en humanos (0.4%). También se encontró la presencia de anticuerpos en monos viejos y otros simios, confirmando la ubicuidad de L.pneumophila.

En humanos se han realizado estudios en diferentes localizaciones geográficas, a distinta edad, sexo y estación del año; Edson y colaboradores (44) y Gregory Sturch y colaboradores (150)

no encontraron ningún cambio significativo en prevalencia de anticuerpos relacionado con los factores mencionados. Edson y colaboradores (44) sólo señalan que disminuye la prevalencia en personas de 60 años o mayores. Además, se estableció una diferencia significativa en prevalencia de anticuerpos en distintas estaciones, observándose en invierno 15.2% y en el verano 29.8%. Helms y colaboradores (80) también realizaron estudios sobre la prevalencia de anticuerpos en una comunidad rural, utilizando sueros de 517 voluntarios encontrando que sí existe diferencia entre hombres y mujeres de 40 años de edad.

Sobre la reactividad inmune celular, Friedman Michele y colaboradores (60) trabajaron con extractos sónicos de L.pneumphila, con preparaciones intactas de la bacteria, con antígeno rico en lipopolisacáridos y con suspensión de flagelos sobre una suspensión de macrófagos de células peritoneales de ratón, encontrando una inhibición transitoria al inicio del cultivo; al segundo y tercer día sólo se observó inhibición parcial y al cuarto y quinto día después, el cultivo de macrófagos mostró actividad normal, llegando a la conclusión de que los efectos supresivos sobre la actividad funcional normal de macrófagos-"invivo" en dichas preparaciones indica que esta bacteria tiene

un efecto perjudicial sobre una importante actividad de las células involucradas en el sistema de respuesta inmune.

Marws Horwits (83) encontró que además de que L.pneumophila es un patógeno que se multiplica intracelularmente en monocitos humanos y macrófagos alveolares, se reproduce dentro de una vacuola citoplasmática al límite de la membrana del monocito, rodeada de ribosomas. Se estudió la formación de esta vacuola poco común, encontrándose que ocurre durante las primeras 4 a 8 horas después de la fagocitosis e involucra una secuencia compleja de eventos citoplasmáticos; después de las ocho horas la bacteria empieza a multiplicarse. La bacteria permanece dentro de la vacuola alineada a los ribosomas hasta que cientos de microorganismos llenan la vacuola y se da la ruptura del monocito.

3. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

El agente causal de la enfermedad de los Legionarios es un bacilo Gram-negativo muy delicado. Debido a que el cultivo de la bacteria es difícil; el diagnóstico inicial de la enfermedad se realiza en base a los datos clínicos del paciente y posteriormente con pruebas serológicas o por la demostración del microorganismo en tejido. Sin embargo la seroconversión ocurre típicamente varias semanas después del inicio del padecimiento no siendo ésta de mucha ayuda en el diagnóstico durante la etapa aguda y las muestras de tejido apropiadas están disponibles en sólo una minoría de los casos; de aquí la dificultad de poder aislar y tipificar esta bacteria por métodos de rutina (24,91, 11, 151,182).

3.1 Aislamiento

Para realizar el aislamiento de la bacteria, por las dificultades que se presentan la toma de muestra se puede llevar a cabo por tres métodos:

- Recolección de expectoración
- Aspirado bronquial
- Biopsia de pulmón.

Las tomas de muestra anteriormente mencionadas se efectúan-

dependiendo del paciente; inclusive en algunos de ellos se realizan los tres métodos obteniéndose resultado positivo en alguno de ellos.

D. Fraser y colaboradores (57) aislaron, a partir de Legionarios que habían muerto víctimas de la enfermedad, una bacteria patógena hasta entonces desconocida y que identificaron como el agente causal. Los motivos por los cuales esta bacteria había escapado a las primeras investigaciones quedaron claras sólo cuando se consiguió su aislamiento y caracterización.

No se descubrió al agente en el curso del aislamiento de bacterias en medios convencionales, sino a través de un procedimiento diseñado para el aislamiento de Rickettsia, microorganismos similares a estas bacterias, que tienen la particularidad de no crecer en medios de cultivo sintéticos, sino que necesitan un huésped vivo para desarrollarse.

El aislamiento consistió básicamente en el uso de un huésped vivo; para esto se trituró un fragmento de tejido pulmonar de un enfermo, se suspendió en una solución amortiguadora y se inoculó en la cavidad abdominal de cobayos que enfermaron presentando la siguiente sintomatología; fiebre muy alta, lagrimeo y postración. En la autopsia se obtuvo el bazo, en el que presu-

miblemente se encontraba el agente patógeno; se procedió a homogenizarlo y la suspensión obtenida se inoculó en el saco vitelino de huevos embrionados de gallina, esto para favorecer el crecimiento del microorganismo que pudiera estar presente en el tejido. Los embriones murieron en un intervalo de cuatro a siete días, después de los cuales se extrajo la membrana del saco vitelino y se realizaron las tinciones tradicionales siendo positiva únicamente en la de Giménez, observándose microorganismos alargados en forma de bacilos, teñidos de color rojo.

A fin de obtener un cultivo del microorganismo se hizo una suspensión de membrana embrionaria, la cual se inoculó por estría en varios medios bacteriológicos, pudiéndose desarrollar únicamente en agar Hinton-Mueller suplementado con 1% de hemoglobina y 1% de Isovitalex con 5% de CO₂ (ver inciso de identificación), procedimiento que permitió determinar que se trataba de una bacteria (27,42,52,57,111,115,128,137,151).

El aislamiento del agente de Legionelosis se ha distinguido por las siguientes propiedades:

- La enfermedad característica que se produce en cobayos.
- La muerte de embriones de pollo después de la inoculación con el microorganismo.

-La presencia de la bacteria por la tinción de Giménez (ver más adelante en tinciones) en los exudados peritoneales de los cobayos, así como en los sacos vitelinos de los embriones de pollo.

-El fracaso en los intentos de desarrollo sobre medios bacteriológicos ordinarios, tales como agar tripticase soya, agar sangre, caldo de tioglicolato y no teñirse con tinciones de rutina. Aislamiento directo.

La recuperación de la bacteria de la enfermedad de los Legionarios por aislamiento directo sobre medios de cultivo artificiales ha sido útil en un pequeño porcentaje de casos reportados; son varias las razones para esta baja proporción de acuerdo con las consideraciones que a continuación se hacen. El microorganismo crece lentamente y los intentos para aislarle del esputo no han tenido éxito, aunque en numerosas ocasiones la bacteria se ha observado en esputo por inmunofluorescencia directa. Se han realizado más aislamientos de fluido pleural o tejido de pulmón, obtenido de biopsias o autopsias de pacientes con la enfermedad. Se han reportado tres casos de aislamientos en el hospital Henry Ford (37), a partir de biopsias de pulmón, así como el aspirado transtraqueal por aislamiento

directo sobre medio de agar chocolate Hinton-Mueller suplementado o agar chocolate que se usa para el aislamiento de Neisseria gonorrhoeae (23,37,41,42,46,91,115,137,151).

Existe un caso en el cual se ha aislado L.pneumophila a partir de sangre de un paciente con dicha enfermedad. El cultivo se preparó en frascos con agar inclinado y caldo, similar al medio de Castañeda; el agar inclinado y el caldo fueron modificaciones del medio Feeley y Gorman (40).

D. Gordon y W. Barnes (36) han mencionado una técnica de cultivo de sangre con centrifugación y lisis en combinación con el medio de cultivo Hinton-Mueller suplementado, para la rápida detección de L.pneumophila; este método aproximadamente de 3 a 4 días.

George Carrington (23) observó que BEL crece muy bien en agar chocolate suplementado, pero se dió cuenta que el crecimiento de la bacteria se ve inhibido por la presencia de esta filococo y demostró que la proliferación de L.pneumophila es inhibida también por otros microorganismos de la flora normal respiratoria, como Klebsiella pneumoniae, Streptococcus pneumoniae, Bacillus sp, Streptococcus del grupo viridans, a las 72-95 horas de incubación.

Thorpe y Miller (159) realizaron un procedimiento de enriquecimiento, el cual es capaz de aislar directamente a L.pneumophila de agua de torres de enfriamiento del sistema de aire acondicionado, sobre un medio artificial. Este procedimiento consistió en incubar la muestra en caldo soya tripticase a 22°C y agregarle una solución de antibióticos (nistatina y vancomicina) y pasarla al medio Feeley-Gorman, incubándola ocho horas; estas condiciones fueron bactericidas para la microflora y bacteriostática para L.pneumophila.

3.2 Identificación

El diagnóstico bacteriológico de la enfermedad de los Legio
narios es difícil por la falta de un buen medio selectivo. Pa
ra aislar in vitro a L.pneumophila, generalmente esto se lleva
a cabo sólo a partir de fluidos y tejidos estériles o en mues
tras contaminadas, tras la inoculación intraperitoneal de coba
yos y huevos embrionados (42).

Se han desarrollado varios medios bacteriológicos para ais
lar e identificar a L.pneumophila. Los principales son los -
siguientes:

Agar Hinton-Mueller suplementado, con 1% de Isovitalex y 1% -
de hemoglobina.

El crecimiento aparece sobre este medio en un intervalo -
de 3 a 5 días a partir de las suspensiones de saco vitelino,
observandose una zona de pigmento oscuro, que rodea a la co
lonia y en medio líquido existe un pigmento soluble de color
café; se cree que el obscurecimiento puede resultar de la for
mación mediada de tirosina a melanina. Se ha visto que la con
centración de L-tirosina puede sustituirse por L-fenil alanina
para la producción del pigmento, ya que la L-fenil alanina pue
de ser convertida a tirosina por un sistema de enzimas; esta
bacteria tiene las dos enzimas, es decir, la L-fenil alanina hi
drolasa y la tirosinasa admitiendo la conversión secuencial de estos

aminoácidos a melanina. El estereoisómero D-tirosina y D-fenil alanina no obscurecen el medio (6, 51, 75, 144).

Agar Chocolate Enriquecido.

Las colonias de L. pneumophila son pequeñas al principio, pero aumentan en diámetro a 3 a 4 mm después de varios días de incubación, son de color gris brillante, su consistencia es viscosa pero generalmente no se puede remover del medio (37).

Agar Feeley y Gorman.

En este medio crece más rápido la BEL que sobre el agar - MH-IH; en 3 días las colonias que se observan son de punta de alfiler, las cuales aumentan con mayor tiempo de incubación y tienen un aspecto de corte de cristal cuando se observan microscópicamente a al luz con un ángulo de 10°.

También se presenta el obscurecimiento alrededor de la colonia, produciéndose una sustancia fluorescente dentro de ella y alrededor del agar, que puede ser detectada por la luz ultravioleta de onda larga a 366 nm; cuando se le adiciona selenato de sodio, las colonias se observan con una coloración naranja rojizo (41, 51, 76, 85, 86, 144).

Agar Extracto de Levadura Carbón (CYE).

El CYE es un medio bacteriológico que mantiene excelente crecimiento de L. pneumophila y es el resultado de modificaciones

realizadas al agar F-G. Las colonias en este medio son visibles en 3 días, a partir de tejido de cobayo infectado; éstas son lisas, escasas, y no se observa obscurecimiento del medio ni el corte de cristal. Se detecta una fluorescencia de color amarillo pálido cuando se examinan a la luz ultravioleta de onda larga a 365 nm, al igual que en el medio líquido (52).

En general en medio líquido se observa un crecimiento filamentososo, además de que se ven numerosos gránulos lipoides intracelularmente (6,130,133,169).

R. Vickers y colaboradores (165) trabajaron con el agar CYE adicionándole 0.001% de púrpura de bromocresol y 0.001% de azul de bromotimol para una identificación presuntiva que permitiera la diferenciación entre miembros de la familia Legionellaceae. Todas las cepas de L.pneumophila producen colonias blancas con una escasa coloración verde sobre el medio, con los colorantes. Las características de las colonias que desarrollan son, redondas, tersas a los 3 días de incubación, en un intervalo de 5 a 7 días las colonias son grandes, aproximadamente 2.5 mm siendo lisas y extendidas, pálidas, opacas y con una coloración verde muy acentuada. Este medio permite la rápida identificación entre L.pneumophila y L.micdadei a partir de muestras clínicas.

K. Holmes (82) menciona otro medio que consta de agar extracto de levadura-carbón, con la adición de azul de anilina, el - cual aumenta las posibilidades de diferenciar a L.pneumophila de otras cuatro especies de la familia Legionellaceae.

Las características de estas colonias son, color gris pálido, circulares, elevadas, enteras y brillantes después de 2 a 3 días de incubación; a los 7 días, las colonias son grandes y - extendidas. Cuando las colonias se exponen a la luz ultravioleta de onda larga, se produce únicamente fluorescencia amarillo verdosa alrededor de la colonia, propiedad que hace diferenciar a L.pneumophila de las otras cuatro especies (82,165).

Tinciones

El agente causante de Legionelosis es una bacteria que no - puede teñirse satisfactoriamente en tejido o exudados de pacientes por métodos convencionales, como las tinciones de Gram, Brown-breen, Brown-hopps, Zeel-Nielsen, Hematoxilina-eosina, Giemsa o modificaciones de ellas (24,37,46,57,76). Existen dos tinciones que permiten observar al microorganismo a partir de tejido o exudado de los pacientes; éstas son:

Tinción de plata de Dieterle.- Esta tinción no es específica - para la BEL; sin embargo en pacientes con evidencia clínica de -

Legionelosis en cuyas muestras patológicas están las formas características de la bacteria que no pueden ser demostradas por la tinción de Gram, con esta técnica se tiene una gran evidencia para el diagnóstico. Esta tinción puede realizarse en todos los fluidos del cuerpo, así como en tejido fijado con formalina o parafina y exudados peritoneales de cobayos infectados. Se observa un número variable de pequeños bacilos obtusos o romos, en ocasiones vacuolados, de color café a negro contra un amarillo pálido del fondo, midiendo 0.4 a 0.8 μ m de ancho y 2 a 4 μ m de largo, que raramente llega hasta arriba de 20 μ m; los microorganismos se localizan en áreas y en gran número dentro de células necróticas de alveólos y bronquiolos afectados.

Se cree que la tinción de plata de Dieterle es el método más sensible para demostrar a la BEL en cortes histopatológicos; la modificación efectuada por Wastthin-Starry da resultados similares y se observa que esta técnica requiere menos tiempo y es más fácil de realizar (24, 37, 57, 85, 111, 156).

Tinción de Giménez.- Esta tinción es útil en frotis de pulmón humano fijado al calor, en secciones de tejido congelado o fijado en formalina, en material procedente de cobayo infectado y en saco vitelino de huevos embrionados, pero no es satisfactoria

en tejido fijado en parafina.

Los bacilos que se observan en frotis de saco vitelino fueron de color rojo, de 0.3 a 0.4 μ m de ancho y generalmente 2 a 3 μ m de largo que ocasionalmente llega hasta 8 a 20 μ m de largo; los bordes de la bacteria normalmente no son paralelos y la parte final se observa frecuentemente en forma puntiaguda (24, 46, 57, 59, 85).

Por el método de Giemsa, en tejido teñido se observan bacilos cortos Gram-negativos, pero no hay color de contraste entre los componentes del tejido y la bacteria (37, 59)

Se puede resumir que cuando en las muestras tomadas de los pacientes no se observan microorganismos por técnicas de Gram o Giemsa y sólo la tinción de plata los tinte, se debe sospechar la presencia de la BEL, especialmente si los hallazgos clínicos y patológicos son coincidentes con la enfermedad.

Pruebas bioquímicas.

la bacteria de la enfermedad de los Legionarios muestra pocas reacciones bioquímicas positivas, que puedan usarse para su identificación.

Con excepción de la utilización del almidón, la bacteria no emplea carbohidratos; sin embargo, sí lo hace con los amino

ácidos, como su mejor fuente de energía y carbón.

	Glucosa	Lactosa	Gas	H ₂ S	Indol	Movilidad	Urea	Catalasa	Oxidasa	Licua la gelatina
<u>L.pneumophila</u>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Reduce nitrito a nitrato, aunque en esto hay controversia, se toma como válido el último dato reportado. Posee una lactamasa e hidrolisa el hipurato de sodio (75 , 76).

El perfil enzimático de L.pneumophila también tiene aplicación ya que por medio de reacciones enzimáticas, se pueden identificar los serogrupos. Presenta aminopeptidasas con actividad contra: L-alanina, L-arginina, L-ac. aspártico, L-cistina, L-ac. glutámico, L-histidina, L-isoleucina, L-lisina, L-metionina , - L-fenil alanina, L-triptofano, L-tirosina y L-valina, también posee actividad de estearasa, pero no de lipasa; se detectaron fosfatasas en un intervalo de pH de 4.5 a 8.5.

Uniendo las anteriores pruebas a métodos más sofisticados, como la composición de ácidos grasos y del DNA, se puede identificar plenamente a L.pneumophila (19,37,42,57,75,76,85,120,123, 127).

Pruebas inmunológicas

Con el fin de una identificación completa y segura de L.pneumophila , se han realizado estudios con diversas técnicas inmuno

lógicas encontrándose la existencia de varios grupos serológicos de dicha bacteria.

Inmunofluorescencia directa

Por este método se han encontrado seis serotipos de L.pneumophila (113,114).

TABLA N° 16 Cepas de L.pneumophila probadas por inmunofluorescencia directa con el conjugado Chicago 2 (sero - grupo 6) (113).

Serogrupo 1	Serogrupo 2	Serogrupo 3	Serogrupo 4	Serogrupo 5	Serogrupo 6
Philadel- phia 1	Togus 1	Bloomington 1	Los angeles 1	Dallas 1	Chicago 2
Knoxville 1	Atlanta 1	Burlington 4	Baltimore 2	Dallas 2	Chicago 3
Bellingham 1	Atlanta 2	Detroit 5	SRP 20	Dallas 3	Chicago 4
Flint 1	Atlanta 4		SRP 22	Burling- ton 1	Houston 2
Albuquer - que 1	Macon 1		SRP 23	Cambridge 2	Oxford 1
Burlinton 1	York 1		SRP 26		Bethesda 1

Esta prueba se ha realizado en esputo, aspirado transtraqueal, bronquial, pulmonar, fluidos pleurales y muestras de tejidos. - Se considera como positiva en fluidos del tracto respiratorio - cuando se observan más de 8 bacterias por campo y en tejido cuando existen al menos 25 (21, 27, 39, 57, 97, 115, 156, 163, 172, 178, 182).

Cherry y colaboradores (27) han evaluado la especificidad-

del conjugado que se utiliza en esta prueba contra 374 cepas-representantes de 25 géneros y 59 especies y no establecen evidencia de reactividad cruzada, excepto con Pseudomona fluorescens.

Según los estudios realizados por Fraser y Mc.Dsde (57), un 70% de los pacientes resultan positivos y los errores en la apreciación parecen ser poco frecuentes.

Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

Esta prueba es la más comúnmente usada para la obtención de diagnóstico retrospectivo de la enfermedad de los Legionarios. Se considera como resultado positivo aquellos aumentos en títulos de anticuerpos de cuatro veces o más entre la fase aguda y la convaleciente.

La especificidad del procedimiento se presenta satisfactoria, aunque el aumento de cuatro veces o más en el título por IFI contra L.pneumophila se ha observado en pacientes con psittacosis, plaga, Tularemia y leptospirosis; tales aumentos en el título se puede postular que son el resultado de antígenos de reacción cruzada, pero Yersinia pestis, Francisella tularensis, y Leptospira interrogans, no reaccionan cruzadamente con la

bacteria de la enfermedad de los Legionarios (21, 27, 57, 99, 102, 111, 137, 163, 173, 175, 176). Así Wilkinson y colaboradores (173) prepararon un inmunoabsorbente con la cepa de E. coli i013: K 92 : HA que bloquea la mayoría de anticuerpos de - reacción cruzada contra una gran variedad de bacterias Gram-negativas.

Microaglutinación (MA)

Farshy y colaboradores (50) demostraron que la prueba de microaglutinación detecta títulos elevados en 97.2% de sueros de pacientes con Legionelosis confirmada. El límite superior del título normal se estableció en 1:8; sin embargo, cuando la prueba se aplica a una sola muestra, un título de 1:32 se considera indicativo de infección con L. pneumophila , no necesariamente enfermedad (92). Collins y colaboradores (30) fijaron el límite más bajo del título positivo, indicando una infección pasada o presente de Legionelosis como 1:64.

Se encontró que el antígeno de Pseudomona pseudomellei da - reacción cruzada con L. pneumophila (93).

Esta prueba mide predominantemente inmunoglobulina de tipo - M (30, 44, 49, 50, 62, 92, 93, 142, 145, 172, 174).

Las pruebas anteriores son las que más se utilizan en la -

identificación de la bacteria de la enfermedad de los Legionarios; pero existen otras técnicas que se están desarrollando, como por ejemplo:

La prueba ELISA.- La cual detecta antígeno soluble en muestras de orina y esputo que se obtienen generalmente sin necesidad de procedimientos invasivos (10, 50, 57, 146, 160, 182).

Inmunodifusión simple.- Soriano y colaboradores (148) usan esta prueba y observan una correlación del 98.0% con la prueba de inmunofluorescencia indirecta.

Hemaglutinación pasiva.- Edson y colaboradores (44) realizan este método y lo comparan con inmunofluorescencia indirecta, observando que es una técnica más simple, rápida y específica.

Mangiafico y colaboradores (107) emplean una prueba inversa a la hemaglutinación pasiva detectan 0.0012 μ g/ml a 0.002 μ g/ml de antígeno total; llegan a la conclusión de que posiblemente el antígeno en sangre es enmascarado por el anticuerpo la mayor parte del tiempo, lo que impide que se pueda detectar.

Lo anterior se comprobó por el estudio realizado por Tilton (160) y Berdal y colaboradores (10) quienes opinan que el antígeno de Legionella pneumophila es excretado en la orina de individuos infectados.

Comentarios de las pruebas

La identificación de L.pneumophila por pruebas serológicas se ha complicado por los recientes hallazgos de serogrupos de esta bacteria, de tal modo que cualquier miembro de estos grupos puede desencadenar la infección, de ahí la necesidad de examinar los sueros de los enfermos frente a anticuerpos representativos de cada grupo.

La prueba IFD permite el rápido diagnóstico en los comienzos del proceso infeccioso, ya que se puede realizar en esputo u otras secreciones respiratorias, en comparación con la IFI que es una técnica que determina infección pasada, ya que por lo general se ha visto que en la segunda semana de la enfermedad se aprecian concentraciones elevadas de anticuerpos en el 50% de los pacientes estudiados, aunque existen algunos casos (aproximadamente 15%), que no presentan anticuerpos sino hasta la sexta semana de enfermedad, no siendo útil esta técnica para el diagnóstico médico sino para un estudio epidemiológico.

Crecimiento en Cultivo de Tejidos.

Con ayuda del microscopio electrónico se han observado formas de L.pneumophila dividiéndose dentro de macrófagos humanos, monos Cynomolgus y cobayos (26,67), pero no está claro si representa multiplicación intracelular de la bacteria o fagocitosis

de microorganismos en proceso de división. Para comprobar si L. pneumophila puede crecer intracelularmente, Wong y colaboradores (179) inocularon cultivos de células de pulmón humano no especializado para fagocitosis y midieron el crecimiento bacteriano ocurrido exclusivamente dentro de las células huésped, - encontrando gran número de microorganismos e incluyendo muchas formas de división dentro de fibroblastos (esto se observó por microscopía de luz y electrónica); la multiplicación intracelular de la bacteria se demostró por el aumento progresivo en la cuenta de colonias bacterianas del extracto del cultivo de fibroblastos infectados, en el cual la multiplicación extracelular se ha eliminado por una concentración bactericida de antibiótico. Es evidente que L. pneumophila puede desarrollarse en un medio ambiente intracelular, verificado con el estudio realizado por Daisy y colaboradores (32) con cultivos de esta bacteria sobre monocapas de tejido de MRC-5, HeLa, Hep 2 y células McCoy, obteniéndose reproducción intracelular de esta bacteria.

4. - Tratamiento

Con base a los resultados vistos en la epidemia de Philadelphia, en la cual los pacientes tratados con eritromicina y tetraciclina presentaron una mortalidad más baja que los enfermos a quienes se les prescribió cefalotina, esteroides, aminoglicósidos, cloranfenicol, ampicilina y penicilina (38), se realizaron otros estudios tanto in vitro como in vivo para ver la susceptibilidad de L.pneumophila frente a los agentes antimicrobianos.

La actividad in vitro investigada por Clyde Thornsberry y colaboradores (158), por el método de dilución en agar con 22 agentes antimicrobianos frente a dicha bacteria. comprendió el estudio de seis cepas, cuatro de la epidemia de Philadelphia, una de Flint, Mich. y la otra de la epidemia de Pontiac. Se observó que la bacteria era sensible a los antibióticos más comúnmente usados, llegando a la conclusión de que el agente más activo resultó ser la rifampicina a una concentración mínima inhibitoria (MIC) de $\leq 0.01 \mu\text{g/ml}$ por microorganismo. Con base en las MIC, los microorganismos pueden ser susceptibles a rifampicina, cefoxin, eritromicina, aminoglicósidos, minociclina, doxiclinas, cloramfenicol y sulfametoxazole-trimetropim (proporción 19:1); de sensibilidad intermedia a la tetraciclina, meti

cilina, cefamandol, cefalotina, clindamicina y resistentes a -
vancomicina (ver TABLAN° 17).

TABLA N° 17 Concentración mínima inhibitoria de 22 agentes an-
timicrobianos frente a seis cepas de la bacteria-
productora de la enfermedad de los Legionarios(158).

Agentes antimicro- bianos	MIC (μ g/ml) por organismo						GM ^b
	1 ^a	2	3	4	5	6	
Penicilina	2.0	2.0	1.0	1.0	2.0	0.5	1.30
Ampicilina	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	0.25	0.90
Carbenicilina	4.0	4.0	2.0	4.0	4.0	0.5	2.60
Meticilina	8.0	8.0	4.0	4.0	8.0	1.0	4.80
Cefalotina	16.0	8.0	4.0	32.0	32.0	32.0	16.0
Cefamandole	16.0	16.0	8.0	4.0	16.0	4.0	9.60
Cefoxin	0.25	0.12	0.12	0.12	0.12	0.06	0.12
Amixacina	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Gentamicina	0.5	0.12	0.25	0.12	0.12	0.25	0.20
Canamicina	2.0	1.0	2.0	2.0	1.0	0.5	1.30
Estreptomina	2.0	1.0	2.0	1.0	1.0	1.0	1.30
Tobramicina	0.5	0.25	0.5	0.5	0.25	0.25	0.36
Eritromicina	0.25	0.12	0.12	0.12	0.5	0.12	0.18
Clindamicina	8.0	16.0	4.0	4.0	8.0	8.0	7.2
Cloramfenicol	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.50
Tetraciclina	8.0	8.0	4.0	4.0	4.0	4.0	5.2
Minociclina	0.5	0.5	0.5	0.25	0.25	0.5	0.43
Doxiciclina	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Rifampicina	-0.01	-0.01	-0.01	-0.01	-0.01	-0.01	-0.01
Vancomicina	32.0	32.0	32.0	16.0	32.0	16.0	32.0
Colistin	4.0	4.0	4.0	2.0	4.0	4.0	3.6
Sulfametoxazole- trimetoprin	4.8/	4.8/	4.8/	4.8/	4.8/	4.8/	4.8/
	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25

a Del 1 al 4 son cepas aisladas de la epidemia de Philadelphia de 1976, el N° 5 es de Flint, Mich., la N°6 de la epidemia de Pontiac Michigan, 1968.

b Media geometrica.

Se observa en la tabla anterior que las cepas de la epidemia de Philadelphia y la de Flint, Mich. son similares en susceptibilidad, y que la cepa de Pontiac es más susceptible a -

las penicilinas.

En los estudios in vivo realizados por Lewis y W.L. Traker (104) en embriones de pollo frente a 10 antibióticos usando cepas de Philadelphia, se vio claramente que la rifampicina fue el más efectivo, ya que previno la muerte del embrión con la mínima cantidad de antibiótico. La eritromicina, que se consideraba la más eficiente contra la bacteria, en esta prueba resultó ser menos potente que la rifampicina, la gentamicina y la estreptomina (104). La sulfadiazina y el cloramfenicol fueron todavía menos eficaces que la eritromicina y se requirió mayor cantidad de cefalotina para la protección completa del embrión.

Así se llegaron a encontrar las seis drogas más efectivas que protegieron de la muerte a los embriones, cuando la dosis se administró 2 a 3 días después de la infección; la rifampicina y la eritromicina fueron los más activos cuando se les dió una dosis simple después de 72 horas de la infección.

Se realizaron también pruebas en cobayos con seis agentes antimicrobianos (36). Para ello se inoculó por vía intraperitoneal el agente causal de la enfermedad de los Legionarios, iniciándose la terapia cuando los animales presentaron temperatu -

ras entre 37.7°C a 40.0°C. Se observó mayor supervivencia en los grupos tratados con eritromicina y rifampicina que a los que se les administró otros antibióticos, viéndose que la rifampicina era más efectiva que el cloramfenicol y la penicilina, y que la eritromicina era más activa que la tetraciclina y la gentamicina. La eficacia de la eritromicina y la rifampicina en el padecimiento causado en cobayos fue del 100% para prevenir la muerte entre los animales que habían recibido antibiótico.

Se hizo otro experimento adicional utilizando cinco antibióticos (125) en animales infectados con una dosis letal; el tratamiento comenzó después de la presencia de los signos clínicos de la enfermedad.

La droga más efectiva fue el clorhidrato de monociclina con una proporción de supervivencia del 50%; las otras sustancias resultaron menos efectivas.

Existe una pequeña correlación en estudios de susceptibilidad in vitro e in vivo. Los aminoglicósidos (gentamicina, tromicina, amikacina) mostraron ser efectivos in vitro, pero esencialmente ineficaces in vivo; sólo la eritromicina y la rifampicina mostraron iguales resultados in vivo e in vitro.

Se encuentra que los datos in vivo se correlacionan bien con la respuesta clínica en el hombre. Así, en la epidemia de Philadelphia y en la de Vermont, el tratamiento con eritromicina fue muy favorable, como también lo fue en los casos sospechosos de Legionelosis de los pacientes del Hospital "Veterans Wadsworth Administration", quienes gracias al tratamiento lograron sobrevivir.

En los pacientes a quienes no se les administró eritromicina, la enfermedad siguió avanzando; sólo uno de ellos respondió frente a altas dosis de ampicilina (91). Con otros enfermos se utilizó penicilina, carbenicilina, oxacilina, gentamicina y clindamicina sin presentar mejoría.

La terapia con eritromicina puede ser oral o intravenosa, pero existe controversia en esto, ya que Saravolats y colaboradores (138) mencionan que existen bajos niveles de eritromicina en pacientes con Legionelosis, cuando la terapia se administró por vía oral y que inclusive uno de los enfermos que se hallaba tomando eritromicina oral por otro padecimiento, desarrolló la enfermedad de los Legionarios. Sin embargo, Kirby y colaboradores (91) no piensan que la eritromicina intravenosa sea necesaria para el tratamiento. Se ha visto que cuando se -

administra a los pacientes la terapia por vía oral, se nota -
mejoría subjetiva en todos los casos dentro de las 12 a 36 pri-
meras horas (promedio 24 horas) retornando la temperatura a-
lo normal en un promedio de 2.4 días (rango de 1 a 6 días);-
en el grupo en el cual la administración fue intravenosa se -
notó mejoría en un promedio de 40 horas (rango de 24 a 96)
y la temperatura retornó a lo normal en un promedio de 6.8 -
días (rango de 1 a 15 días) (91).

La dosis intravenosa que se recomienda es de 2 a 4 g dia-
riamente y la oral de 2 g diariamente(137). El promedio de du-
ración de la terapia con este antibiótico fue de 16 días, aun-
que se recomienda que el tratamiento se extienda durante tres
semanas; En pacientes inmunocomprometidos, la medicación oral
no ha dado buenos resultados, siendo necesario cambiaba a in-
travenosa (138).

Cuando exista una respuesta lenta a eritromicina, o en el
caso de presencia de abscesos pulmonares, se puede adicionar-
rifampicina (72).

5.- Comentarios.

La bacteria Legionella pneumophila es un bacilo Gram-negativo, causante de neumonía humana y de infecciones sistémicas.

Es un patógeno facultativo intracelular, el cual se reproduce en el interior de los monocitos de sangre humana, macrófagos alveolares e in vitro en cultivos de tejido.

En el inicio del descubrimiento de esta bacteria se presentaron varios problemas en su aislamiento debido a la dificultad de crecimiento en medios bacteriológicos comunes, por lo que fue necesario realizar una serie de estudios a este respecto, hasta que en septiembre de 1979 se encontró que se podía obtener un aislamiento directo a partir de muestras clínicas en agar extracto de levadura carbón como medio de rutina; a partir de mayo de 1980 a la fecha se recomienda que a este medio se le adicione un antibiotico y colorantes para mejor obtención de dicha bacteria (152, 175).

En general, esta bacteria se ha encontrado en diversos lugares ecológicos los cuales pueden ser : tierra húmeda, estanques, sistemas de aire acondicionado, torres de enfriamiento, equipos de hospital, en cañerías, agua potable y no potable, lagos, y ríos.

En el mundo se han localizado diversos casos patológicos, pero no existe un patrón geográfico a este respecto; en Mexico no se ha reportado la existencia de este padecimiento.

Su trasmisión se efectúa principalmente por medios naturales, como corrientes de aire y también por mecanismos artificiales, como son básicamente los sistemas de aire acondicionado, observándose la propagación por aerosoles. Estadísticamente existe un gran número de casos de Legionelosis en hospitales, en hoteles y edificios, en donde comúnmente se utiliza este tipo de instalaciones.

Es importante considerar que no se ha encontrado un contagio de persona a persona, observándose que aquellos individuos con un sistema inmunocomprometido presentan mayor susceptibilidad a esta enfermedad.

El tratamiento que se recomienda es el uso de eritromicina.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Andersen D. Richard, Brian A. Laver, David W. Fraser, Peggy S. Hayes, and Kenneth Mc Intosh(1981).
Infections with Legionella pneumophila in children.
J. Infec. Dis. Vol 143, N°3 p386-390.
- 2.- Arko J. R. ; K.H. Wong, Ph; and John C. Feeley, Ph. D.(1979)
Immunologic factors affecting the In vivo and In vitro -
survival of the Legionnaires' disease bacterium.
Ann Int Med 90: 680-683.
- 3.- Bacheson A. Margaret, Harvey M. Friedman, and Charles E. -
Benson. (1981).
Antimicrobial susceptibility of intracellular Legionella -
pneumophila
Antimicrob Agents Chemother Vol 20, N°5 P 691-192.
- 4.- Baine B. William, J. Kamile Rasheed, Donald C. Mackel, Cheryl A. Bopp, Joy G. Wells, and Arnold F. Kaufman (1979)
Exotoxin activity associated with the Legionnaires disease bacterium.
J. Clin Microbiol. vol 9, N° 3, p.453-456.
- 5.- Baine B. William, J. Kanile Rasheed, H. William Mac. D., and Arnold F. Kaufmann (1979).
Hemolytic activity of plasma and urine from rabbits experimentally infected with Legionella pneumophila.
Rev. Infec. Dis. vol 1, N° 6 , p. 912-917.
- 6.-Baine B. William, M.D; and J. Kamile Raseed, M.S; (1979)
Aromatic sustrate specificity of browning by cultures of the Legionnaires' disease bacterium.
Am. Intern. Med 90:619 -620.
- 7.- Bartlett R.L.C. (1979)
Sporadic cases of Legionnaires' disease in Great Britain
Ann Int Med vol 90, p. 592-595.
- 8.- Barrett James
Introducción a la inmunoquímica y la inmunobiología
Editorial Interamericana. 1972
- 9.- Beaty N. Harry, M.D; Albert A. Miller, M.D; Claire V. Broome, M.D; Stella Goings, M.D; Charles A. Phillips, M.D(1978)
Legionnaires' disease in Vermont May to October 1977
JAMA, vol 240, N° 2 P. 127-131.
- 10.- Berdal P. B., Carol E. Farshy and John C. Feeley. (1979)
Detection of Legionella pneumophila antigen in urine by --
enzyme- linked immunospecific assay.
J. Clin. Microbiol vol 9, N° 5 , p. 575-578.

- 11.- Berendt F. Richard (1980)
Survival of Legionella pneumophila in aerosols: effect of relative humidity
J. infec Dis. vol 141, N° 5 p. 689
- 12.- Berendt F. Richard, Harol D. W. Young, Richard G. Allen, - and Gary L. Knutsen (1980)
Dose- response the Guinea pigs experimentally infected w- with aerosols of Legionella pneumophila
J. infect Dis. vol 141, N° 2
- 13.- Blackmon A. Jhon, M.D; Russell A. Harley M.D; Martin D. - Hicklin, M.D; and Francis W. Charler, DVM. Ph D; and Charleston (1979).
Pulmonary sequelae of acute Legionnaires' disease pneumonia.
Ann Int. Med 90 : 552- 554
- 14.- Blaser Martin (1977)
Hot- Bath syndrome, pontiac fever, and Legionnaires' disease.
Lancet vol 2 p1226
- 15.- Bock v Bonnie, Barbara D Kirby, Paul H. Edelstein, William George, Kim M Snyder, Milton L Owens, carole M. Hatayama, Charles E. Haley, Robert P. Lewis, Richard D Meyer, Synney M.Finegold (1978)
Lancet 1 : 410-413
- 16.- Bottach Gregory A. and Irvin S. Snyder. (1983)
Characterization of surfaces involved in adherence of Legionella pneumophila to Fischerella Species.
Infect. Immun vol 42, N° 1 ,p 318-325.
- 17.- Bottach A. Gregory and Irvin S Snyder (1983)
Cyanobacterial stimulation of growth and oxigen uptake by Legionella pneumophila.
Appl Microbiol vol 46, N° 2, p. 528-531.
- 18.- Boys F. J. , W. M. Buchaman, Mac Leod, R. I. Shaw Dunn, - and W. P. Weir. (1978)
Pathology of five Scottish deaths from pneumonic illnesses acquired in Spain due to Legionnaires' disease agent.
J. Clin Pathol 31: 809-816.
- 19.- Brenner J. Don, Ph D; Arnold G. Steigerwalt, B. S.;and Joseph E. Mc. Dade (1979)
Classification of the Legionnaires' disease bacterium: Legionella pneumophila, genus, novum. species nova, of the family Legionellaceae, family nova.
Ann Inter med. 90: 656-658.

- 20.- Broonme V. Claire, M.D.; Stella A. J. Goings, M.D.; Stephen B. Thacker, M.D.; Richard L. Vogt, M.D.; Harry N. Beauty, M.D.; David W. Fraser, M. D.; and the Field investigation team (1979).
The Vermont Epidemic of Legionnaires' disease
Ann Intern Med 90: 573-577.
- 21.- Broome V. Claire, M.D.; William B. Cherry, Ph.D; Washington C. Winn, M.D.; and Bruce R. Macpherson (1979)
Rapid diagnostic of Legionnaires' disease by direct Immunofluorescent staining.
Ann Intern Med 90: 1-4.
- 22.- Carrington B.C. (1979)
Pathology of Legionnaires' disease
Ann Intern Med vol 90: 496-498
- 23.- Carrington O. George (1979)
Legionnaires' disease bacillus inhibition by normal flora
Clin Microbiol News vol 1, N° 12
- 24.- Chandler Francis W. , D.V.M., Ph.D., Martin D. Hicklin M. D., M.P.H., and Jhon A. Blackmon, M.D.(1977)
Demonstration of the agent of Legionnaires' disease in tissue.
N. Engl. J. Med. vol 297, N° 22, p.1218-1220
- 25.- Chandler W. F, D.V.M, Ph.D; R. M. Cole, Ph.D., M.D. Hicklin J. A. Blackmon, M.D! and C.S. Callaway, B.S. (1979)
Ultrastructure of the Legionnaires' disease bacterium
Ann Intern Med 90: 642-647
- 26.- Chandler W.F. , D.V.M., Ph.D; J.E. Mc Dade; M.D. Hicklin, J.A. Blackmon, M.D.; B.M. Thomason, B.S.; and E.P. Ewing, Jr, M. D. (1979).
Pathologic Findings in Guinea Pigs inoculated intraperitoneally with the Legionnaires' disease bacterium.
Ann Intern Med 90: 671-675.
- 27.- Cherry William B. , Bertie Pittman, Patricia P. Harris, G. Ann Hebert, Berenice M. Thomason, Leroy tracker and Robert E. Weaver. (1978)
Detection of Legionnaires' disease bacterium by direct immunofluorescent staining.
J. Clin Microbiol vol 8, N° 3, P. 329-338.
- 28.- Cherry William B, Bertie Pittman, Patricia P. Harris, G.-Ann Herbert, Berenice M. Thomason, Leroy Thacker, and Robert E. Weaver(1978)
Detection of Legionnaires' Disease bacterium by direct immunofluorescent staining.
J. Clin Microbiol Vol 8, N° 3, p. 329-339.

- 29.- Cohen L.M., C.V. Broome, A.L. Paris, W.T. Martin, and J.R. Allen. (1979)
Fatal nosocomial Legionnaires' disease clinical and epidemiologic characteristics.
Ann Intern. Med. vol 90 ,p. 611-613.
- 30.- Collins T. Michael, Sang- Nae CHO, and John S. Reif (1982)
Prevalence of antibodies to Legionella pneumophila in animal populations.
J.Clin Microbiol vol.15,N° 1,p. 130-136.
- 31.- Cordes G. L. , Hazel W. Wilkinson, G.W. Gorman, Bonnie J. Fikes, and D.W. Fraser (1979).
Atypical Legionella- like organisms fastidious water-associated bacterium pathogenic for man.
Lancet ii 3: 927-930.
- 32.- Daisy A. Jeffrey, Charles E. Benson, Jhon Mc.Kitrick, and Harvey M. Friedman (1981).
Intracellular replication of Legionella pneumophila
J. Infect Dis. vol N° 3, p. 460-464.
- 33.- Davis Bernard, Renato Dulbecco, Herman Eisen, and H. Ginsberd.
Tratado de Microbiología
Editorial Salvat 1976
- 34.- Dondero J. Timothy, Jr; M.D.; Herbert W. Clegg, M.D.; Theodore F. Tsai, M.D.; R. Mark Weeks, M.P.H.; Eleanor Duncan Janis Strickler; R.N.; Charles Chapman, M.D.; George F. Mallison, M.P.H.; Brenda Politi D.V.M.; Morris E. Potter, - and William Shaffner (1979).
Legionnaires' disease in Kingsport, Tennessee.
Ann Intern Med. 90: 569-573.
- 35.- Dondero J. Timothy, Jr; M.D. Robert C. Rendtorff, George-F. Mallison , M.P.H.; R. Mark Weeks, Joe S Leoy, M.D.; Edward W. Wong, M.D. and William Schaffner (1980).
An outbreak of Legionnaires' disease associated with a contaminated airconditioning cooling tower.
N. England. J. Med vol 302, N° 7, p.365-370.
- 36.- Dorn Gordon L. and Wayne R. Barnes (1979).
Rapid isolation of L.pneumophila from seeded donor blood.
J Clin microbiol vol 10,N° 1 , P. 114-115.
- 37.- Dumoff Morris, Ph; (1979)
Direct in-vitro isolation of the Legionnaires' disease bacterium in two fatal cases.
Ann intern Med. 90: 694-696.

- 38.- Edelstein H. Paul (1981).
Improved semiselective medium for isolation of Legionella pneumophila from contaminated clinical and environmental specimens.
J.Clin Microbiol vol 14, N° 3 , p. 289-303.
- 39.- Edelstein H.P., R.M.Mckinney, R.D. Meyer, M.A.C. Edelstein C. J. Krause and S.M. Finegold (1980)
Immunologic Diagnosis of Legionnaires' disease: Cross-reactions with anaerobic y microaerophilic organisms and infections caused by them.
J Infect Dis. vol 141, N° 5, p.652-655.
- 40.- Edelstein Paul H. ; Richard D. Meyer Sydney M. Finegold (1979).
Isolation of Legionella pneumophila from blood.
Lancet april 7.
- 41.- Edelstein Paul H. and Sydney M. Fine Gold (1979).
Isolation of Legionella pneumophila from a trantraqueal - aspirate.
J. Clin Microbiol Vol 9, N° 3 ,p. 457-458.
- 42.- Edelstein Paul H. and Sydney M. Finegold.(1979)
Use of a semiselective medium to culture Legionella pneumophila from contaminated lung specimens.
J. clin microbiol Vol 10, N°2,p.141-143.
- 43.- Edelstein H. Paul, Richard D. Meyer, and Sydney M. Fine - gold (1981).
Long-tem followup of two patients with pulmonary cavitation caused by Legionella pneumophila
Am. Rev respir Dis 124: 90-93.
- 44.- Edson N.C. Daniel M.S.!(Harlan E. Stiefel), B.S.; Berttina-B. Wentworth Ph. D.; and David L. Wilson, B.S. (1979).
Prevalence of antibodies to Legionnaires' disease (A sero epidemiologic survey of Michigan residents using the hema glutination test).
Ann Intern Med 90: 691-693.
- 45.- Eickhoff C. Theodore M.D. (1979).
Epidemiology of Legionnaires' disease.
Vol 90: p 499-501. Ann Inter Med N° 4
- 46.- Faine Solly, Paul Edelstein, Barbara D. Kirby and Sydney M. Finegold (1979).
Rapid presuntive bacteriological diagnosis of Legionnai - res' disease.
J. Clin. microbiol vol 10, N° 1, p.104-105
- 47.- Fallon J.R. and W.H. Abraham (1978).
Detecting Legionnaires' Disease
Lancet 2: 1318

- 48.- Fallon J. Ronald, M.D.; William H. Abraham (1979)
Scottish experience with the serologic diagnosis of Legionnaires' disease.
Ann Intern Med 90: 684-686.
- 49.- Farshy E. Carol, B.S.; Donna D. Cruce M.S.; George C. Klein M.S.; Hazel W. Wilkinson, Ph.D.; and Johan C Feeley, (1979).
Immunoglobulin specificity of the microagglutination test for the Legionnaires' disease bacterium.
Ann Intern Med. 90: 690.
- 50.- Farshy Carol F., George C. Klein y Jhon C. Feeley (1978).
Detection of Antibodies to Legionnaires' disease organism by microagglutination and micro-enzyme-linked immunosorbent assay tests.
J. Clin Microbiol vol 7, N°4 p.327-331.
- 51.- Feeley James C, George W. Gorman, Robert F. Weaver, Don C. Mackel, and Hollis W. Smith (1978).
Primary Isolation media for Legionnaires' disease bacterium.
J.Clin Microbiol vol 8, N°3, p. 320-325.
- 52.- Feeley James C. , Robert J. Gibson, George W. Gorman, Nancy C. Langford, J. Kamile Rasheed, Don C. Mackel and William B. Baine (1979).
Charcoal- yeast extract agar: Primary isolation medium for Legionella pneumophila
J. Clin Microbiol vol 10, N° 4 , p. 437-441.
- 53.- Finnerty R.W. Ph.D; R.A. Makuld, PhD; and James C. Feeley, (1979).
Cellular lipids of the Legionnaires' disease bacterium.
Ann Intern Med 90: 631-634.
- 54.- Flesher R. Alam, Ph.D; Susumu Ho, Bernard J. Mansheim, M.D. and Dennis L. Kasper , M.D.(1979).
The cell envelope of the Legionnaires' disease bacterium.
Ann Intern Med. 90:628-630.
- 55.- Foy Mhjordis, Claine V. Broome, Peggy S. Hayes, Inez Allam, Marion K. Cooney, Robert Tobe (1979).
Legionnaires' disease in a prepaid medical care group in Seattle 1963-75.
Lancet April 7, p. 767-770.
- 56.- Fraser W. David; I. Kaye Wachsmuth; Cheryl Bopp; James C. Feeley; Theodore F. Tsai. (1978).
Antibiotic treatment of guinea-pigs infected with agent of Legionnaires' disease.
Lancet vol 1 p.175-177.

- 57.- Fraser W. David and Joseph E. Mc. Dade(1979)
Legionellosis
Investigación y ciencia ,Diciembre 1979, p.48-59.
- 58.- Fraser W. David, M.D.Theodore R.,Tsai,M.D., Walter Drenstein, M.D., William E. Parkin, D.V.M., Dr P.H.(1977).
Legionnaires' disease . Description of on epidemic of Pneumonia.
N Engl J. Med vol 297, N° 22 , p.1189-1197.
- 59.- Frenkel K.L.,M.D.; Larry H. Baker, M.D.; and Arnold M. Chonko, M.D. (1979).
Autopsy diagnosis of Legionnaires' disease in immunosuppressed patients.
Ann Intern Med. 90: 559-562.
- 60.- Friedman Michelle, Thomason W. Klein and Herman Friedman-(1983).
Legionella pneumophila induced supression of macrophage - spreading In vitro.
Infect Immun vol 42, N° 1 ,p. 421-423.
- 61.- Friedman Richard L, Barbara H. Sgiewski, and Richard D. - Miller (1980).
Identification of a cytotoxin produced by Legionella pneumophila.
Infect Immun vol 29, N° 1 p 271-274.
- 62.- Frobisher Martin, Robert Fuerst.
Microbiología
Editorial Interamericana.1976
- 63.- Fu. P. Kwung and Harold C. Neu (1979)
Inactivation of -Lactam antibiotics by Legionella pneumophila .
Antimicrob Agents Chemother vol 16, N° 5, p. 561-564.
- 64.- Fumarola Donato(1980)
Culture procedures in the avirulent conversion of Legionella pneumophila.
J. Infect Dis. Vol 141, N° 1 p. 124.
- 65.- Garrity C.M., E.M. Elder, B. Davis, R.M. Vickers and A. - Brown(1982).
Serological and Genotipic Diversity among serogrups-reacting environmental Legionella isolates.
J. Clin Microbiol Voo 15, N°4, p 646-653.
- 66.- George J. Richard, Leopine, Michekael W. Reeves, and Knox Harrell (1980).
Amino acid requeriments of Legionella pneumophila.
J. Clin. Microbiol vol 11, N° 3, p. 286-291.

- 67.- Glavin L. Frederick, M.D.; Washington C. Winn, Jr, M.D.; and John E. Craighead (1979).
Ultrastructure of lung in Legionnaires' disease.
Observations of three Biopsies done during the Vermont epidemic.
Ann Intern Med. 90: 555-559.
- 68.- Grady F.G.; and R.F. Gilfillan (1979).
Relation of Mycoplasma pneumoniae seroreactivity, immunosuppression, and chronic disease to Legionnaires' disease a twelve-month prospective study of sporadic cases in Massachusetts.
Ann Intern Med Vol 90 , p. 607-610.
- 69.- Gregory David, M.D., William Schaffner, M.D.; and Zell A. Mc Gee, M.D. (1979).
Sporadic cases of Legionnaires' disease the expanding clinical spectrum.
Ann Intern Med. 90 : 518-521.
- 70.- Grist R.N., M.D., D. Reid, M.D.; and R. Najera M.D. (1979)
Legionnaires' disease and the traveller. Epidemiology.
Ann Intern Med 90: 563-564.
- 71.- Guerrant O.G., M.S. Lambert and C.W. Moss. (1979)
Identification of diaminopimelic acid in the Legionnaires' disease bacterium.
J. Clin microbiol vol 10, N° 6 p.815-818.
- 72.- Gump W. Dieter, M.D.; Robert O. Frank; Wahington C.Winn, Jr M.D.; Roger S. Foster; Claire V. Broome and William B Cherry (1979).
Legionnaires' disease in patients with associated serious disease.
Ann Intern Med. 90: 538-542.
- 73.- Gump W. Dieter (1982)
Legionnaires' disease and fever of Known origin.
Scand J. Infect. Dis 14: 75-78.
- 74.- Haley E.C., M.L. Choen, J. Halter, and R.D. Meyer (1979)
Nosocomial Legionnaires' disease: A continuing common-source epidemic at Wadsworth medical center.
Ann Intern Med. Vol 90: 583-586.
- 75.- Hebert Ann G. (1981)
Hippurate hydrolysis by Legionella pneumophila
J. Clin Microbiol Vol 13, N° 1 , p. 240-242.
- 76.- Herbert Ann G. , B.S.; C. Wayne Moss, Ph. D.; Linda Kirven-Mc. Dougal, M.S.; F. Marylin Bozerman, M.S.; Roger M. McKin

- ney, and Don J. Breener (1980)
The rickettsia-like organisms Tatlock (1943) and Heba (1959): bacteria phenotypically similar to but genetically distinct from Legionella pneumophila and the Wiga bacterium. Ann Intern Med 92: 45-52.
- 77.- Hebert Ann G., B.S.; Berenice M. Thomason. B.S.; Patricia-P. Harris, M.S.; Martin D. Hicklin, M.D.; and Roger M. McKinney (1980)
" Pittsburgh pneumonia agent" : A bacterium phenotypically similar to Legionella pneumophila and identical to the Tatlock bacterium.
Ann Intern Med 92: 53-54.
- 78.- Hedlund W. Kenneth, M.D.; Virginia G. McGann, Ph.D.; Diana S Copeland, D.V.M.; Stephen F. Little, B.S.; and Richard G. Allen (1979).
Immunologic protection against the Legionnaires' disease -- bacterium in the AKR/S mouse.
Ann Intern Med 90: 676-679.
- 79.- Helmke J.R. , S.S. Kalter, and R.L. Heberling (1981);
Distribution of Legionella pneumophila antibody among primate species.
J. Clin Microbiol Vol 13, N° 3 , p.508-512.
- 80.- Helms Charles M, Edward D. Renner, Jhon P. Viner, Walter J. Hierholzer, Jr., Laverne A. Wintermeyer and William - Johnson (1980).
Indirect immunofluorescence antibodies to Legionella pneumophila : frequency in a rural community.
J Clin Microbiol vol. 12, N° 3 p. 326-328.
- 81.- Helms M. Charles, M.D., Ph D; Jhon P. Viner, M.D.; Randall H. Sturm, M.D.; Edward Renner, Ph D.; and William Johnson (1979)
Comparative features of pneumococcal, mycoplasmal and Legionnaires' disease pneumonias.
Ann Intern Med 90: 543-547.
- 82.- Holmes L. Rustin (1982)
Aniline Blue-containing buffered charcoal-yeast extract - medium for presumptive identification of Legionella species
J Clin Microbiol vol 15, N°4 , p.723-724.
- 83.- Horwitz Marcusa (1983).
Formation of a Novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (Legionella pneumophila) in human monocytes (1983).
J. Exp. Med. 158 (4): 1319-1331.

- 84.- Hudson P. Robert, M.D (1979).
Lessons from Legionnaires' disease.
Ann Intern Med 90: 704-707.
- 85.- Isenberg D. Henry (1979)
Microbiology of Legionnaires'
Ann Intern Med 90: 502-502.
- 86.- Johnson W., E. Pensanti, and J. Elliot (1979)
Seroespecificity and opsonic activity of antisera to Legionella pneumophila .
Infect Immun Vol 26, N° 2 , p. 698-704.
- 87.- Johnson, William, Ph.D.; Jhon A. Elliot, B.S. Charles M. Helms, and Edward D. Renner (1979)
A high molecular weight antigen in Legionnaires' disease bacterium: isolation and partial characterization.
Ann Intern Med 90: 638-641.
- 88.- Jones L. Frederick, Jr.; H. James Beecham III; Jhon J. Denney M.D. (1978)
Sporadic Legionnaires' Disease
Jama Feb 13, Vol 239, N° 7 p640-641.
- 89.- Jorgensen Anker Kaj, Birgithe Korsager, Guvar Johannsen, - Leif G. Freund and Hazel W. Wilkinson.(1981)
Legionnaires' disease imported to Denmark from Italy
Scand J infect Dis 13: 133-136.
- 90.- Keel A.J., M.S.; Finnerty and James C. Feeley (1979)
Fine structure of the Legionnaires' disease bacterium.
Ann Intern Med 90: 652-655
- 91.- Kirby D. Barbara; Kim M. Snyder; Richard D Meyer; F.A.C.P.- and Sydney M. Finegold (1978)
Legionnaires' disease: clinical features of 24 cases.
Ann Intern Med 89: 297-309
- 92.- Klein C. George, Wallis L. Jones, and Jhon C. Feeley (1979)
Upper limit of normal titer for detection of antibodies - to Legionella pneumophila by the microagglutination test.
J. Clin Microbiol Vol 10 , N°5 p 754-755.
- 93.- Klein C. George (1980)
Cross-reaction to Legionella pneumophila antigen in sera with elevated titers to Pseudomonas pseudomallei.
J. Clin Microbiol Vol 11, N° 1, p.27-29.
- 94.- Knudson Gregory B and Perry Mikesell (1980)
A plasmid in Legionella pneumophila
Infect Immun vol 29, N° 3, p. 1092-1095.

- 95.- Knudson B. Gregory and Perry Mikesell (1980)
A plasmid in Legionella pneumophila.
Infect Immun Vol 29,N° 3, p. 1092-1095.
- 96.- Kwung P. Fu and Harold C. Nev.(1979)
Inactivation of -lactam-antibiotics by Legionella pneumo-
phila.
Antimicrob Agents Chemother Vol 16, N° 5 , p. 561-564.
- 97.- Lattimer Garyl, Cindy Mc Crone, and Jhon Galgon (1978)
Diagnosis of Legionnaires' disease from transtracheal as-
pirate by direct fluorecent- antibody staining and isola-
tion of the bacterium.
N. Engl J. Med Vol 299, N° 21 p. 1172-1173.
- 98.- Lattimer L. Gary, and Luther V. Rhodes (1978).
Legionnaires' disease. Clinical findings and one- year -
follow up.
Jama , vol 240, N° 11 p. 1169-1171.
- 99.- Lattimer L. Gary,Luther V. Rodes; John S Salventi; John
P. Galgon; Victor Stonebraker; Sharon Boley.; and Garyha-
as (1979).
The Philadelphia epidemic of Legionnaires' : Clinical,pul-
monary and serologic two years later.
Ann Intern Med 90: 522-526.
- 100.- Lees W. Andrew, William F. Tyrrell (1978).
Severe cerebral disturbance in Legionnaires' disease
Lancet 2: 1336- 1337.
- 101.- Lehniger L. Albert
Bioquimica
Editorial Omega S.A. 19 76
- 102.- Lennette David A , Evelyne T. Lennette, Berttina B. Went-
worth, Morris L. V. French, and Gary L. Lattimer (1979).
Serology of Legionnaires' Disease: comparation of indi-
rect fluorescent antibody, immune adherence hemagglutina-
tion and indirect hemagglutination tests.
J.Clin Microbiol Vol,10, N° 6 ,p. 876-879.
- 103.- Lerner Phillip and Julian Kassen 1979
Legionnaires' disease and Acinetobacter bacteremia
Ann Intern Med Vol 90 N° 3, p. 434-435.
- 104.- Lewis J. Wester, W. Lanier Thacker, Charlies C. Sherpard
and Joseh E. Mc Dade (1978)
In vivo susceptibility of the Legionnaires' disease bac-
terium to ten antimicrobial agents.
Antimicrob Agents Chenother vol 13, N° 3 p. 419-422.

- 105.- Macrae D.A. and M.J. Lewis (1977).
Legionnaires' disease in Nottingham
Lancet december 10, p. 1225-1226.
- 106.- Macrae D.A., P.M. Appleton, A Laverick (1979)
Legionnaires' disease in Nottingham , England.
Ann Intern Med vol 90: 580-582.
- 107.- Mangiafico A Joseph; Kenneth W. Hedlund and Allen R.Knott
(1981)
Rapid and sensitive method for quantitation of Legionella pneumophila serogrupo 1 antigen from human urine.
J. Clin Microbiol vol, 13, N°5, p. 843-845.
- 108.- Marks,S. James M.D.; Theodore F. Tsai; William J. Martone,
Roy C. Baron ; Jerri Kennicott; Frank J. Holtzhaver; Ian
Baird;Dale Fay; James C. Feeley; George Mallison; David-
W. Fraser and Thomas J. Halpin (1979).
Nosocomial Legionnaires' disease in Columbus,Ohio
Ann Intern Med. 90: 565-569.
- 109.- Mayberry R. William (1981)
Dihydroxy and monohydroxy fatty acids in Legionella pneu-
mophila.
J. Bacter vol 147, N° 2 p. 373-381.
- 110.- Mc Dade E. Joseph; Don J. Brenn; and Marilyn Bozeman (19
79).
Legionnaires' disease bacterium isolated in 1947.
Ann Intern Med 90: 659-661.
- 111.- Mc Dade Joseph E., Charles C. Shepard, David W. Fraser ,
M.D.; Theodore R. Tsai, M.D. (1977).
Legionnaires' Disease. Isolation of a bacterium and demon-
stration of its role in other respiratory disease.
N.Engl J. Med vol 297, N° 22 p. 1197-1203.
- 112.- Mc Dade E. Joseph and Charles C Shepard (1979)
Virulent to avirulent conversion of Legionnaires' disease
bacterium (Legionella pneumophila) . Its effect on iso-
lation techniques.
J. Infect Dis Vol 139, N° 6 p. 707-711.
- 113.- McKinney Roger M. , Hazel W. Wilkinson, Herbert M. Sommers,
Bonnie J. Fikes, Karen R. Sasseville, Margaret M. Yung Bluth
and James Wolf.(1980).
Legionella pneumophila serogroup six: isolation from ca-
ses de Legionellosis, identification by immunofluorescen-
se staining, and immunological response to infection.
J. Clin Microbiol vol12,N° 3 , p.395-401.

- 114.- McKinney M. Roger, Leroy Thacker; Patricia P. Harris ; - Karen R. Lewallen; G. Ann Hebert; Paul H. Edelstein and Berenice M. Thomason (1979).
Four serogroups of Legionnaires' disease bacterium defined by direct immunofluoresens.
Ann Intern Med 90: 621-624.
- 115.- McKinney M. Roger; Berenice M. Thomason, Patricia P. Harris ; Leroy Thaker; Karen R. Lewallen ; Hazel W. Wilkinson, G. Ann Hebert, and C. Wayne Moss(1979).
Recognition of a new serogroup of Legionnaires' disease-Bacterium.
J. Clin Microbiol vol 9, N° 1 p. 103-107.
- 116.- Meen Horst L. Pieter; Jos W. M. Van der Meer, M.D; and - Jan Borst (1979).
Sporadic cases of Legionnaires' disease in the Netherlands.
Ann Intern Med. 90: 529-532.
- 117.- Miller C. Andrew, M.D. ; D. Phil (1979).
Early clinical differentiation between Legionnaires' disease and other sporadic pneumoneas.
Ann Intern Med 90:526-528.
- 118.- Miller C. A. ; S.B. Pearson; W.H. Roderick Smith(1978).
Legionnaires' disease: radiological resolution and bronchoscopy.
Lancet vol 2 :170.
- 119.- Miller P. Robert, B.SM.E.; (1979).
Cooling Towers and Evaporative condensers.
Ann Intern Med 90: 667-670.
- 120.- Morgan R. J. , Ryder R., A Paull, J. R. Thomas(1979).
Antibodies in Hospital staff exposed to Legionnaires' disease.
Lancet, may 19, p.1083.
- 121.- Morris K. George; Charlotte M Patton; James C. Feeley; - Gorman George, Scott E. Johnson; William T. Martin; Peter Skaly; George F. Mallison; Brenda D. Politi, and Don C - Mackel (1979).
Isolation of the Legionnaires' disease bacterium from environmental samples.
Ann Intern Med. 90: 664-666.
- 122.- Moss C. W., R.E. Weaver, S.B. Dees and W.B. Cherry(1977).
Cellular fatty acid composition of isolation from Legionnaires' disease.
J. Clin Microbiol Vol 6, N° 2, p. 140-143.

- 123.- Müller E. Hans (1981).
Enzymatic profile of Legionella pneumophila.
J. Clin Microbiol vol 13, N° 2, p. 423-426.
- 125.- Nash P. ; L. Siderman; V; Pidcoe; B. Kleger (1978).
Minocycline in Legionnaires' disease.
Lancet 1:45 Jan 7
- 124.- Müller E. Hans. (1980)
Proteolytic action of Legionella pneumophila on human -
serum proteins.
Infect Immun vol 27, N° 1 , p 51-53.
- 126.- Neblett R. Thomas; Jeanne M. Riddle, and Morris Dumoff -
(1979)
Sufarce topography and fine structure of the Legionnaires'
disease bacterium.
Ann Intern Med 90: 648-651.
- 127.- Nolte Fredericks, Gary F. Hollick and Richard G. Robert-
son (1978).
Enzimatic activities of Legionella pneumophila and Legio-
nella- like organisms.
J.Clin Microbiol Vol,15, N° 1 p. 175-177.
- 128.- Ormsbee R. A., M.G. Peacock, G.L. Lattimer, LA Page, and
P. Fiset (1978).
Legionnaires' disease: antigenic peculiarities, strain -
differences and antibiotic sensitivities of the agent.
J. Infect. Dis. vol 138, N° 2 p. 260-264.
- 129.- Politi D.B., D.W. Fraser, G. F. Mallison. J.U. Mohatt, G.
K. Morris, C. M. Patton, J.C. Feeley, R.D. Telle and J.V
Bennett (1979).
A major focus of Legionnaires' disease in Bloomington, -
Indiana.
Ann Intern Med Vol 90: p. 587-591.
- 130.- Pine Leo, J. Richard George, Michael W. Reeves, and W -
Knox Harrell (1979).
Development of a chemically defined liquid medium for -
growth of Legionella pneumophila .
J. Clin Microbiol vol 9, N° 5 p. 615-626.
- 131.- Reeves W. Michael, Leo Pine, Seymour H. Hutner, J. Richa
rd Geord and W. Knox Harrell (1981).
Metal requerimients of Legionella pneumophila.
J. Clin Microbiol. Vol 13, N°4 , p. 688-695.
- 132.- Renner D. E.; C.M. Helms; W.J. Hierhdzer; N. Hall, Y. W.
Wong, J.P. Viner, W. Johnson, and W. J. Hawsler (1979).
Legionnaires' disease pneumonea patiens in Iowa. A retros
pective seroepidemic study, 1972- 1977.

Ann Intern Med vol 90: 603-606.

- 133.- Ristroph Joseph D; Kenneth W. Hedlund, and Richard G. - Allen (1980).
Liquid medium for growth of Legionella pneumophila.
J. Clin Microbiol. Vol 11, N° 1 , p. 19-21.
- 134.- Ristroph D. Joseph, Kenneth W. Hedlund, and Srinivas Gowda (1981).
Chemically defined medium for Legionella pneumophila - growth
J. Clin Microbiol Vol 13, N° 1, p. 115-119.
- 135.- Saito Atsushi; Rial Rolfe, Paul H. Edelstein and Sydney M. Finegold (1981).
Comparison of liquid growth media for Legionella pneumophila.
J. Clin Microbiol vol 14, N° 6 p. 623-627.
- 136.- Sanford P. Jay, M.D.; Blethesda Mayland (1979).
Legionnaires' disease: one person's perspective.
Ann Intern Med 90: 699-703
- 137.- Sanford P. Jay , M.D. (1979).
Legionnaires' disease the first thousand days.
N. Engl J. Med. 300: 654-656.
- 138.- Saravolatz D. Louis; Keith H. Burch; Evelyn Fisher ; Tom Madhavan; Daria Kiani; Thomas Neblett and Edward L. Quinn (1979).
The compromised host and Legionnaires' disease
Ann Intern Med 90: 533-537.
- 139.- Saravolatz L. , L. Arking, B. Went Worth, and E. Quinn (1979).
Prevalence of antibody to the Legionnaires' disease bacterium in hospital employees.
Ann Intern Med. vol 90 : 601-603.
- 140.- Saravolatz D. Louis, Donald J. Pohlod , and Edward L. - Quim (1979).
In vitro susceptibility of Legionella pneumophila serogrupos I-IV.
J. Infect Dis. Vol 140, N° 2 p.251.
- 141.- Sharrar G. R.; H.M. Friedman, W.T. Miller, M.J. Yanak - and E. Abrutyn (1979).
Summertime pneumonias in Philadelphia in 1976. An epidemiologic study.
Ann Intern Med. Vol 90, 577-579, N°4

- 142.- Skaliy Peter, and Harold V. Mc. Eachern (1979)
Survival of the Legionnaires' disease bacterium in water
Ann Intern Med vol 90, N° 4 p. 662-663.
- 143.- Skaliy Peter, Terry A Thompson, George W. Gorman, George K. Morris, Harold V. Mceachen and Donald C. Mackel (1980)
Appl Microbiol Vol 4 , N° 4 p. 697-700.
- 144.- Smalley L. David; Percy A. Jaquess, and Joseph S. Layne (1980).
Selenium-enriched medium for Legionella pneumophila .
J. Clin. Microbiol vol 12, N° 1 p. 32-34.
- 145.- Smalley L. David and Donald D. Ourth (1981).
Comparison of the microagglutination test with bactericidal response to Legionella pneumophila .
J. Clin Microbiol vol 11, N° 2 p. 200-201.
- 146.- Smilt A. Randall, Samuel Di Giorgio, James Darner , and Ann Wilhelm (1981).
Detection the Legionella pneumophila the antigens envelope capsular for counter immunoelectrophoresis.
J. Clin Microbiol vol 13, N°4 p. 637-642.
- 147.- Snowman R. Whitney, Frank J. Holtzhafer, Thomas J. Halpin, Adolfo Lorrea Villaseñor (1982).
The role of indoor and outdoor occupations in the seroepidemiology of Legionella pneumophila.
J. Infect Dis. Vol 145, N° 2 february p. 275.
- 148.- Soriano Francisco, Lorenzo Aguilar and Jose Luis Gomez-Gárces (1982).
Simple Immunodiffusion test for detecting antibodies - against Legionella pneumophila sero type 1.
J. Clin Microbiol vol 15, N° 2 p. 330-331.
- 149.- Storch G. , W.B. Baine, D. W. Fraser, C.V. Broome, H.W. Clegg II, M.L. Cohen, S.A.J. Goings, B.D. Plikaytis, C. C. Shepard, and J.V. Bennett. 1979
Sporadic community acquired Legionnaires' disease in the states. A case control study.
Ann Intern Med vol 90 596-600.
- 150.- Storch Gregory, Peggy S. Hayes, Dianne L. Hill, and William B. Baine (1979).
Prevalence of antibody to Legionella pneumophila in middle-aged and Elderly Americans.
J. Infect Dis. vol 140, N° 5 p.784-788.

- 151.- Swartz N. M. (1979).
Clinical aspects of Legionnaires' disease.
Ann Intern Med vol 90: 492-495.
- 152.- Taylor G. A. ; T. G. Harrison, Mabel W. Dighero; and Patricia Bradstreet (1979).
False positive reactions in the indirect fluorescent antibody test for Legionnaires' disease eliminated by use of formalised yolk-sac antigen.
Ann Intern Med. 90: 686-689.
- 153.- Terranova William, Mitchell L. Cohen and David W. Fraser (1978).
Outbreak of Legionnaires' disease diagnosed in 1977.
Lancet 2: 122-124.
- 154.- Tesh J. Martha and Richard D. Miller (1981).
Amino acid requirements for Legionella pneumophila growth
J. Clin. Microbiol Vol 13, N° 5 p.865-869.
- 155.- Thaker B. S., J. V. Benonh, T. F. Tsai, D. Fraser, J. Mc dade, C.C. Shepard, K.H. Williams, W.H. Stuart, H.B. Dull, and T. C. Eickhoft (1978).
An outbreak in 1965 of several respiratory illnesses caused by the Legionnaires' disease bacterium.
J. Infect Dis vol 138, N° 4 p 512-519.
- 156.- Thomason M. Berenice, Avis van orden, Francis W. Chandler, and Martin D. Hicklin (1979).
Effect of various histological fixatives on fluorescent antibody detection of Legionnaires' disease bacterium.
J. Clin Microbiol vol 10, N° 1, p 106-108.
- 157.- Thomason M. Berenice; Francis W. Chandier; and Dannie - Hollis (1979).
Flagella on Legionnaires' disease bacterium: An Interim report.
Ann Intern Med vol 91, N° 2 p 224-225.
- 158.- Thornsberry Clyde, C.N. Baker and L.A. Kirven (1978).
In vitro activity of antimicrobial agents on Legionnaires' disease bacterium.
Antimicrob agents chemother vol 13, N° 1 p 78-80.
- 159.- Thorpe C. Thurman and Richard D. Miller (1980)
Negative enrichment procedure for isolation of Legionella pneumophila from seeded cooling tower water.
Appl Microbiol vol 40, N° 4 p 849-851.
- 160.- Tilton C. Richard (1979).
Legionnaires' disease antigen detected by enzyme-linked Immunosorbent assay.

Ann Intern Med 90: 697-698,

- 161.- Tison, D.L! D.H. Pope, W. B. Cherry (1980)
Growth of Legionella pneumophila in association with -
blue- green algae (cyanobacterium).
Appl Environ Microbial 39: 456-459.
- 162.- Tsai F. Theodore; David R. Finn, Brihn D. Plikaytis; Wi
lliam Mc. Cauley; Stainley M. Martin; and David Fraser-
(1979).
Legionnaires' disease: Clinical feactures of the epide-
mic in Philadelphia.
Ann Intern Med 90: 509-517.
- 163.- Tsai T.F. , Fraser DW. 1979
The diagnosis of Legionnaires' disease.
Ann Intern Med Vol 89 N°3 p413-414 editoriales.
- 164.- Vogel R. Frederik, Thomas W. Klein, Steven C. Specter,-
Maryl Hitchin G.S. and Herman Friedman (1981).
Detection of antibodies to Legionella pneumophila in im
mune guinea pig serum by solid - phase immunofluorescen
ce.
J. Clin Microbiol vol 13, N° 4 p. 726-729.
- 165.- Vickers M. Richard, Arnold Brown, and George M. Garrity
(1981).
Dye- containing buffered charcoal yeast extract medium-
for differentiation of members of the family Legionella
ceae.
J. Clin Microbiol Vol 13, N°2 p. 380-382.
- 166.- Walder Mats, Birgh A. Suanteson, Jan Ursing, Stig Cron-
Berg, Torsten Jhonsson and Arne Forsgren (1981)
Incidence of Legionella pneumophila in Acute lower respi
ratory tract infections.
Scand J. Infect Dis 13: 159-160 .
- 167.- Wang W. L.L., M.J. Blaser, J. Cravens, B.,S. and Marcia
A. Johnson (1979).
Growth, durvival, and resistancia of the Legionnaires'-
Disease bacterium.
Ann Intern Med. 90: 614- 618.
- 168.- Ward A. Peter.(1979)
Farmington connecticut immonology and immunopathology of
Legionnaires' disease.
Ann INterm Med. vol 90: 506-508.
- 169.- Warren William J. and Richard D. Miller(1978)
Growth of Legionnaires' disease bacterium in chemically
Defined Medium.
J. Clin Microbiol Vol 10, N° 1 p 50-55.

- 170.- Wayne Moss C. and S.B. Dees (1979)
Further studies of the cellular fatty acid composition-
of Legionnaires' disease bacterium.
J. Clin Microbiol vol 9, N° 5 p 648-649.
- 171.- Wayne Moss C, R.E. Weaver, S.B. Dees, and W.B. Cherry -
(1977).
Cellular fatty acid composition of isolates from Legionnaires' disease.
J. Clin. Microbiol vol 6, N° 2 p 140-143.
- 172.- Wilkinson W. Hazel and Bonnie J. Fikes (1980)
Slide agglutination test for serogrouping Legionella pneumophila and atypical Legionella like organisms.
J. Clin. Microbiol vol 11, N°1 p.99-101.
- 173.- Wilkinson W. Hazel, Donna Cruce and Claire V. Broome(1981)
Validation of Legionella pneumophila indirect immunofluorescence assay with epidemic sera.
J. ClinMicrobiol Vol 13, N° 1 p 139-146.
- 174.- Wilkinson W. Hazel and Bonnie J. Fikes (1981)
Detection of cell associated or soluble antigens of Legionella pneumophila serogroups 1 to 6, Legionella Bozemani, L. gormanii and L. Micdadei by Staphylococcal coagglutination test.
J. Clin Microbiol. Vol 14, N° 3 p. 322-325.
- 175.- Wilkinson w. Hazel, Bonnie J. Fikes and Donna D. Crude -
(1979).
Indirect immunofluorescence test for serodiagnosis of Legionnaires' disease: evidencia for serogroup diversity - of Legionnaires' disease bacterial antigens and for multiple specificity of human antibodies.
J. Clin Microbiol vol 9, N° 3 p. 379-383.
- 176.- Wilkinson Hazel W., Carol E. Farshy, Bonnie J. Fikes, Donna D. Cruce and Lynn P. Yealy (1979).
Measure of immunoglobulin G-M; and A specific titers against nospecific Gram-degative bacterial antigens in the indirect immunofluorescence test for Legionellosis.
J. Clin Microbiol. Vol 10, N° 5 p 685-689.
- 177.- Winn C. Washington ; Federick L. Glavin; Daniel P. Perl, and John F.Craighead(1979)
Macroscopic pathology of the lungs in Legionnaires' disease.
Ann Intern Med 90: 548-551.
- 178.- Winn C. Washington, William B. Cherry, Robert O Frank, - Cecilia A. Casey, and Claire V. Broome (1980).
Direct immunofluorescent detection of Legionella pneumo-

phila in respiratory specimens.

J. Clin Microbiol Vol 11 , No 1 p. 59-64.

- 179.- Wong Maec, Edwin Pewing , Carey S. Callaway and William-L. Pedcock (1980)
INtracellular multiplication of Legionella pneumophila -
in cultured human embryonic lung fibroblasts
Infect Immun Vol 28, N° 3 p. 1014-1018
- 180.- Wong, H. Moss, Mochstein, and W.O. Schalla (1979).
Endotoxicity of the Legionnaires' disease bacterium.
Ann Intern Med 90: 624-627.
- 181.- Wong h. K.; W. O. Shalld, R.J. Arko; J.C. Bollard, and -
C. Feeley (1979).
Immunochemical , serologic, and Immunologic proprieties-
of major antigens isolated from the Legionnaires' disease
bacterium.
Ann Intern Med. 90: 634-638.
- 182.- Zurauleff J. Jeffery. M. S; Victor L. Yu; John W. Shon -
nard; Bridgett K. Davis and John D. Rihs(1983)
Diagnosis of Legionnaires' methods with new emphasis on-
isolation by culture.
Jama vol 250, N° 15 p. 1981-1985
- 183.- Zurauleff J. Jeffrey, Victor L. Yu; John W. Shonnard, -
John D.Rihs, and michele Best (1983).
Legionella pneumophila contamination of a hospital humi-
difier. Demostration of aerosol transmission and subce -
quent subclinical infection in exposed quinea pigs.
Am Rev Respir Dis 128: (4); 657-61.