



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
UMAE HOSPITAL GENERAL G.G.G.  
CENTRO MEDICO NACIONAL "LA RAZA"

**Comparación del procesamiento térmico y enriquecimiento para la recuperación de *Legionella pneumophila* en especímenes bronquiales inoculados en el medio de cultivo BCYE**

**TESIS**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN

**PATOLOGÍA CLÍNICA**

**PRESENTA:**

DR. JESUS BERNABE LICONA VELA

**DIRECTOR DE TESIS:**

QFB. MARIA DEL SOCORRO MENDEZ TOVAR



Ciudad de México  
2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

**Comparación del procesamiento térmico y enriquecimiento para la recuperación de *Legionella pneumophila* en especímenes bronquiales inoculados en el medio de cultivo BCYE**



---

Dra. Maria Teresa Ramos Cervantes

Encargada de Dirección de Educación e Investigación en Salud  
UMA E Hospital General Dr. G.G.G C.M.N. "La Raza"



---

Dra. Rita Concepción Gutiérrez

Profesora adjunta de la Especialidad en Patología Clínica C.M.N. "La Raza"



---

Asesor

QFB. Maria Del Socorro Méndez Tovar

Jefe de Sección de Bacteriología Médica U.M.A.E. Hospital General "Dr. Gaudencio González y Garza" Centro Médico Nacional La Raza.



---

Dr. Jesús Bernabe Licon Vela

Médico Residente de Tercer Año de la Especialidad de Patología Clínica U.M.A.E. Hospital General "Dr. Gaudencio González Garza" C. M. N. "La Raza".

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es una evidencia más del empeño que me enseñó mi familia a perseguir mis proyectos y metas en la vida con disciplina, esfuerzo y actitud.

Gracias Madre **Ana Carolina de Jesús**, por brindarme todo tu apoyo desde mi nacimiento. Eres mi principal motor del cual aprendí a trabajar con esmero. Tu Fe, admirable.

Gracias Hermanos **Carolina** y **Yesser**, siempre es reconfortante saber que estén ahí para levantarme el ánimo y continuar en los momentos difíciles.

Gracias **Padre, Tíos, Primos, Amigos** por otorgarme su valioso tiempo y compartir gratos recuerdos.

Gracias al personal de Bacteriología Médica, especialmente a las Químicas **Socorro Méndez** y **Magdalena Ramírez** por su apoyo incondicional.

Y principalmente, Gracias **Dios**, me has bendecido con una familia cordial, amable y fraternal.

## INDICE

RESUMEN.....	5
INTRODUCCION.....	8
ANTECEDENTES CIENTÍFICOS.....	9
JUSTIFICACIÓN.....	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	23
OBJETIVOS.....	25
MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
RECURSOS, FINANCIAMIENTO Y FACTIBILIDAD.....	32
CONSIDERACIONES ETICAS.....	33
CRONOGRAMA.....	34
RESULTADOS.....	35
GRAFICAS.....	37
DISCUSIÓN.....	42
CONCLUSIONES.....	45
BIBLIOGRAFIA.....	46

## RESUMEN

**Título:** Comparación del procesamiento térmico y enriquecimiento para la recuperación de *Legionella pneumophila* en especímenes bronquiales inoculados en el medio de cultivo BCYE.

Licona J. <sup>(1)</sup> Méndez M. <sup>(2)</sup> Médico Residente del Hospital General UMAE Dr. Gaudencio González Garza <sup>(1)</sup>. Jefe de Sección Bacteriología Medica del Hospital General UMAE Dr. Gaudencio González Garza <sup>(2)</sup>.

**Antecedentes:** *Legionella pneumophila* fue identificada por primera vez en 1977 como el agente causal de un brote de neumonía que ocasionó la muerte de 34 personas en la Convención de Legionarios de 1976, por lo que se le llamó la “enfermedad de los legionarios”. Actualmente se han identificado 42 especies y más de 64 serogrupos. *Legionella pneumophila* serogrupo 1, responsable de más de 90% de los casos de legionelosis, es un bacilo Gram negativo de 0,3 a 0,9 µm de ancho y desde 1,5 a 15 µm de largo. Se puede presentar como cocobacilo en los tejidos infectados y formas bacilares alargadas en los medios de cultivo. Desde el punto de vista metabólico es aerobia estricta, capnófila, poco sacarolítica. Los aminoácidos son su principal fuente de energía. Es catalasa, oxidasa y gelatinasa positiva.

**Objetivo General:** Identificar la presencia de *Legionella pneumophila* en especímenes bronquiales a través del procesamiento térmico y de enriquecimiento en el medio de cultivo BCYE.

**Metodología:** Estudio transversal, prospectivo, comparativo, analítico. Se procesaron las muestras de secreción y/o lavado bronquial en los siguientes pasos: centrifugación, tinción de Gram, siembra en medio de cultivo BCYE por diferentes procesos: 1) inoculación directa sin descontaminación, 2) muestras en descontaminación térmica (introducidas a baño maria en tubos cónicos a temperatura de 50°C durante 30 minutos) seguidas de inoculación por técnica de asa en medio de cultivo BCYE. 3) muestras enriquecidas en Tioglicolato durante 24 horas a 35-37°C, descontaminación térmica (introducidas a baño maria en tubos cónicos a temperatura de 50°C durante 30 minutos) y siembra por técnica de asa en medio de cultivo BCYE. 4) muestras descontaminadas por calor, después inoculación en medio de enriquecimiento con Tioglicolato durante 24 horas a 35-37°C y posterior siembra por técnica de asa en medio de cultivo BCYE.

**Resultados:** Se analizaron 42 especímenes –secreciones bronquiales- de pacientes de acuerdo a los criterios de inclusión. Se realizó una comparación estadística entre los diferentes grupos de tratamiento con respecto al número de microorganismos aislados (prueba de Kruskal-Wallis y post-hoc de Dunn) encontrándose una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo 1 y 4 ( $p=0.03$ ), al comparar a los demás grupos no se encontró diferencia estadísticamente significativa.

**Conclusiones:** Se encontró una microbiota normal; más frecuente oportunista y emergente. Se evidencia que la simple inoculación en el medio de cultivo para el procesamiento de los especímenes no es suficiente para erradicar a la microbiota

saprofita; incluso combinando ambos procesos (térmico y enriquecimiento) es factible encontrarlos. Se propone un algoritmo de procesamiento interno para el aislamiento de *Legionella pneumophila*: utilizar tratamiento térmico durante 30 minutos a 50°C y posterior enriquecimiento con caldo nutritivo BHI bajo una sospecha diagnóstica manifiesta.

## INTRODUCCION

En los próximos párrafos se describirá brevemente acerca de las características físico-químicas, metabolismo y fisiopatogenia, entre otras, de la protagonista principal y agente etiológico de la Enfermedad de los Legionarios: *Legionella pneumophila*, microorganismo un poco más difícil de recuperar en especímenes respiratorios, por lo cual, en este trabajo se abordara el planteamiento de un tratamiento térmico (descontaminación) y de enriquecimiento para su mejor recuperación en el medio de cultivo BCYE.

## ANTECEDENTES CIENTIFICOS

*Legionella pneumophila* fue identificada por primera vez en 1977 como el agente causal de un brote de neumonía que ocasionó la muerte de 34 personas en la Convención de Legionarios de 1976, por lo que se le llamó la “enfermedad de los legionarios”<sup>1</sup> después de la inhalación de aerosoles contaminados. El principal reservorio de estos microorganismos es el agua.<sup>17</sup> Este brote de neumonía en personas que acudían a la convención de la Legión Estadounidense en Filadelfia, a la que se dio amplia difusión, fue el punto de partida de investigaciones que definieron la participación de *Legionella pneumophila* y las demás. Desde 1947 se hizo el diagnóstico retrospectivo de otros brotes de trastornos respiratorios causados por microorganismos similares.<sup>4</sup> El impacto mediático de brotes como los de Filadelfia, Holanda, Murcia o Mataró, entre otros muchos, ha llevado a pensar que esta asociación era lo más frecuente.<sup>2</sup> En la actualidad se conocen dos formas clínicas y epidemiológicas de la infección por *Legionella*: la “enfermedad de los legionarios (forma neumónica) y la “fiebre de Pontiac” (forma no neumónica).<sup>1</sup>

**Taxonomía.** *Legionella* pertenece al Dominio: Bacteria; Linaje: Gamma Proteobacteria; Orden: *Legionellales*; Familia: *Legionellaceae*; Género: *Legionella*. Actualmente se han identificado 42 especies y más de 64 serogrupos. *Legionella pneumophila* serogrupo 1, responsable de más de 90% de los casos de legionelosis, es un bacilo Gram negativo de 0,3 a 0,9 µm de ancho y desde 1,5 a 15 µm de largo. Se puede presentar como cocobacilo en los tejidos infectados y

formas bacilares alargadas en los medios de cultivo. Desde el punto de vista metabólico es aerobia estricta, capnófila, poco sacarolítica. Los aminoácidos son su principal fuente de energía. Es catalasa, oxidasa y gelatinasa positiva.<sup>3</sup> Es necesario realizar extensiones teñidas con el método de Gram si se sospecha la proliferación de *Legionella* en medios de agar. Como contra colorante habrá que usar fucsina básica (0.1%), porque apenas tiñe dicha bacteria la safranina.<sup>4</sup> Las legionelas de importancia primaria en medicina se incluyen en el cuadro 1.

Especie	Neumonía	Fiebre de Pontiac
<i>Legionella pneumophila</i>	+	Serogrupos 1 y 6
<i>Legionella micdadei</i>	+	
<i>Legionella gormanii</i>	+	
<i>Legionella dumoffii</i>	+	
<i>Legionella bozemanii</i>	+	
<i>Legionella longbeachae</i>	+	
<i>Legionella wadsworthii</i>	+	
<i>Legionella jordanis</i>	+	
<i>Legionella feeleii</i>	+	+
<i>Legionella oakridgensis</i>	+	

Cuadro 1. Especies de *Legionella* de importancia medica primaria.<sup>4</sup>

**Epidemiología de la Legionelosis.** A finales de los años noventa, en Europa y según la Organización Mundial de la Salud, se advirtió un aumento en el número de países con aportación de datos referida a la enfermedad, aun siendo muy variable su incidencia. Las tasas correspondientes al año 1999 variaban desde 19.5 por millón de habitantes en Bélgica a uno por millón de habitantes en Portugal; mientras que España presentaba una tasa de 7.8. Sin embargo, estos datos podrían estar infravalorados con respecto a la incidencia real, debido a la existencia de *Legionella* sp. no consideradas por estar desvinculadas del sector

turístico.<sup>5</sup> La neumonía por *Legionella* es frecuente, especialmente aquellas que aplican cultivo, antigenuria y serología en donde la prevalencia de la infección por este microorganismo oscila entre el 6 y el 13%, ocupando la segunda o tercera posición dentro de las causas de NAC bacterianas estudiadas en el ámbito hospitalario.<sup>2</sup> *Legionella* se encuentra en pequeñas colonias en fuentes naturales de agua como ríos, lagos, aguas termales y arroyos; puede sobrevivir en condiciones ambientales muy diversas. Para que su concentración aumente lo suficiente y cause riesgo a los humanos (más de 10,000 UFC/mL), se requieren condiciones de temperatura idóneas para su multiplicación (25 a 45°C). En estos sitios, la *Legionella* puede infectar a las personas si el agua se disemina en forma de aerosoles, por lo tanto, la vía de transmisión es aérea, de manera que la bacteria viaja por el aire en pequeñas gotas y es inhalada por las personas. No existen evidencias de contagio de persona a persona. *Legionella* afecta con frecuencia a personas previamente sanas, principalmente varones. También los pacientes de edad avanzada con comorbilidades (enolismo, enfermedad pulmonar obstructiva, tabaquismo), o con alto riesgo de infección son los que se encuentran severamente inmunocomprometidos, en particular las personas trasplantadas.<sup>1</sup> En los enfermos con SIDA, aunque la incidencia de legionelosis es similar a la de la población no infectada por el VIH, la enfermedad suele ser más grave.<sup>6</sup> Los factores de riesgo adicionales son cirugías recientes, intubación endotraqueal y el uso de equipos de terapia del tracto respiratorio. La colocación de sonda nasogástrica se tomó como un factor de riesgo en pacientes intubados en dos estudios prospectivos. La letalidad es de 5 a 30%, sin embargo, suele ser baja (<5%) en pacientes inmunocompetentes tratados adecuadamente. Las

instalaciones con mayor frecuencia de contaminación por *Legionella* y se identifican como fuentes de infección son: sistemas de agua sanitaria caliente y fría, torres de refrigeración y condensadores evaporativos, spas y jacuzzis. La falta de un diagnóstico preciso en algunos casos así como la carencia de herramientas diagnósticas adecuadas podrían ser razones para que se asuma que las infecciones por *Legionella* no están ocurriendo en nuestro medio.<sup>9</sup>

**Patogenia.** *L. pneumophila* penetra y prolifera fácilmente en macrófagos y monocitos de alvéolos de seres humanos y no es destruida de modo eficaz por los polimorfonucleares. *In vitro*, cuando hay anticuerpos séricos pero no inmunitarios, se deposita en la fracción C3 del complemento en la superficie bacteriana y la bacteria se fija a los receptores CR1 y CR3 de complemento en la superficie del fagocito. La penetración en la célula es un fenómeno fagocítico en que interviene la formación de un pseudópodo alrededor de la bacteria. Cuando se cuenta con anticuerpos inmunitarios, la penetración mencionada se hace por la fagocitosis más típica mediada por la fracción Fc. En el interior de las células bacterias individuales están dentro de vacuolas fagosómicas, pero los mecanismos de defensa de los macrófagos no penetran y por ello se detienen en ese punto. Disminuye la fase metabólica oxidativa repentina e intensa del fagocito. Los fagosomas que contienen *L. pneumophila* muestran acidificación menor respecto a los que contienen otras partículas ingeridas, así como alrededor de las vacuolas se acumulan ribosomas, mitocondrias y pequeñas vesículas. Las bacterias se multiplican en el interior de las vacuolas hasta que alcanzan gran número,

destruyen las células, son liberadas y así se produce la infección de otros macrófagos. Para la proliferación intracelular de las bacterias es esencial la presencia de hierro (transferrina-hierro), pero no se conocen en detalle otros factores que son importantes para procesos como proliferación, destrucción celular y daño tisular.<sup>4</sup>

**Cultivo e Identificación de Legionella.** El aislamiento de esta bacteria en cultivo es el método de referencia y proporciona un diagnóstico confirmatorio de la infección. La sensibilidad del cultivo en muestras respiratorias oscila entre un 20 y 80% variando en función del tipo de muestra, siendo la especificidad del 100%. Esta baja sensibilidad se debe, entre otros, a los siguientes factores: la naturaleza de la bacteria que crece con dificultad aún en medios selectivos<sup>6</sup>, la calidad de medio de cultivo (factor crítico en el aislamiento de *Legionella*) así como los retrasos en el procesamiento de muestras respiratorias, el uso previo de las terapias antimicrobianas y el crecimiento excesivo de otras bacterias de la orofaringe en el medio son factores adicionales que limitan los rendimientos del cultivo. El procesamiento de las muestras por calor o tratamiento previo con tampón ácido, también es crítico para aumentar la sensibilidad de cultivo mediante reducción de la proliferación de otras bacterias.<sup>15</sup> Todas las muestras para el cultivo de *Legionella* deben manipularse y procesarse en un gabinete de bioseguridad clase II.<sup>10</sup> Las muestras recomendadas para realizar el cultivo de la bacteria incluyen secreciones respiratorias, tejido pulmonar, sangre y, en función del tipo así como el nivel de contaminación, pueden ser agrupadas en:

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

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

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

D) Otras muestras menos frecuentes, como líquido pleural, líquido cefalorraquídeo (LCR) o sangre.<sup>6</sup>

Para el cultivo de *Legionella* se utiliza agar BCYE (*buffered charcoal yeast extract*) agar de carbón tamponado y extracto de Levadura que contiene 0,1% de alfa-cetoglutarato, es el medio base utilizada para su recuperación a partir de muestras ambientales y clínicas.<sup>7</sup> En 1979, Feely et al describieron el agar CYE (agar de carbón y extracto de levadura) como una modificación de un medio existente, el agar F-G. Reemplazaron el almidón en el agar F-G con carbón activado y sustituyeron el extracto de levadura con hidrolizado de caseína, lo que permitió una mejor recuperación de *L. pneumophila*. En 1980, Pasculle informo que el agar CYE podía mejorarse añadiendo tampón ACES al medio. Un año después, Edelstein aumento aún más la sensibilidad del medio añadiendo alfa-cetoglutarato (Agar BCYE).<sup>8</sup> Para el primer aislamiento las placas deben incubarse a 35-37°C, en condiciones de aerobiosis, humedad y aunque el crecimiento de la bacteria

generalmente empieza a ser visible a partir del tercer día de incubación, los cultivos se deben mantener en estas condiciones 10-12 días antes de considerarlos negativos. Cuando se procesan muestras contaminadas (esputo) se recomiendan tratamientos de descontaminación, los tratamientos utilizados son de 2 tipos, calor (50°C 30min) y tratamiento ácido (pH de 2.2 durante 5 min).

**Detección de anticuerpos en suero:** utiliza la detección de IgG mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) o mediante análisis inmuno-enzimático (ELISA) de muestras respiratorias. Puesto que la elevación de los títulos en 4 diluciones se considera significativa para infección aguda por *L. pneumophila*, se requiere repetir serología a las 8-12 semanas del inicio de la sintomatología. El diagnóstico de presunción es a partir de una dilución 1:128 y definitivo >1:256. El periodo óptimo de seroconversión es a las 12 semanas. La sensibilidad, con estos criterios de positividad, varía entre 25% y 75%.<sup>12</sup>

**Detección de Antígeno de Legionella en muestras de orina.** El antígeno detectado es un componente soluble del lipopolisacárido (LPS) de la pared celular de *Legionella*, es termoestable, y es detectable desde el inicio de la sintomatología, y en algunos casos hasta muchos meses después (en algún caso hasta más de un año), no viéndose los resultados claramente influenciados por la administración previa de antibióticos. Estos antígenos se han detectado por varias técnicas, como aglutinación con partículas de látex, hemaglutinación pasiva y

enzimoinmunoensayo (EIA). En la actualidad existen varias técnicas de EIA comercializadas, siendo las de Binax, Biotest y Bartels las más utilizadas. La sensibilidad empleando orina concentrada es similar en los tres EIA (80-90%), con una especificidad del 98-100%, destacando la elevada sensibilidad del EIA de Bartels empleando orina directa (60-75%), que casi permite obviar la necesidad de concentrar la orina.<sup>6</sup> La enfermedad del legionario (LD), una forma de neumonía severa, se diagnostica principalmente por la detección de antígeno urinario, sin embargo, el aislamiento de *Legionella* en las secreciones respiratorias por el cultivo se considera el estándar de oro para el diagnóstico debido a su especificidad superior.<sup>15</sup>

**Detección de Legionella muestras clínicas por técnicas de Biología molecular.** Se pueden realizar en muestras de origen respiratorio (exudado faríngeo, lavado broncoalveolar), suero y en muestras de orina.<sup>12</sup> El Kit iQ-Check *Legionella* PCR en tiempo real incluye cebadores de ADN y sondas fluorescentes altamente específicas para los organismos blancos. Si *Legionella* spp o *Legionella pneumophila* está presente en la muestra, el ADN se amplifica y el aumento de la fluorescencia se monitoriza y se registra en tiempo real por los sistemas termociclador Bio-Rad. Se utiliza un ensayo multiplex con dos colorantes: sondas para el ADN blanco y el control interno, cada uno marcado con diferentes fluoróforos, están en el mismo tubo. El conjunto de estándares suministrados con los kits asegura la automática cuantificación de *Legionella* spp. y *Legionella pneumophila* sin pasos adicionales.<sup>13</sup>

**MALDI-TOF** es una metodología de ionización suave utilizada en espectrometría de masas que representa una técnica analítica instrumental de alta sensibilidad capaz de identificar cuali- y cuantitativamente cualquier tipo de mezclas de sustancias. Asimismo, esta técnica también permite determinar la masa molecular de un compuesto, y la de los diversos fragmentos que resultan de la rotura del mismo, proporcionando una información muy valiosa sobre la estructura de la molécula. La denominación "MALDI" deriva de las siglas de las palabras en inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (desorción/ionización láser asistida por matriz) y "TOF" alude al detector de iones que se acopla al MALDI, que es del tipo de tiempo de vuelo (*Time of Flight*). El MALDI-TOF es una técnica muy utilizada en proteómica para la identificación de microorganismos mediante el método de la huella peptídica. En este método, las proteínas desconocidas en estudio son hidrolizadas en pequeños péptidos cuyas masas absolutas se determinan mediante un espectrómetro de masas. La huella de tamaños de péptidos obtenida, que es única para cada microorganismo, es comparada con las huellas de microorganismos conocidos presentes en la base de datos de tal forma que la huella problema se puede asociar estadísticamente con la huella más semejante y realizar así la identificación del Microorganismo. Las proteínas que conforman la huella peptídica de cada microorganismo son las ribosomales debido a que se comportan como proteínas estructurales y a que se mantienen una estructura altamente conservada a lo largo del tiempo. De manera complementaria también se incluyen proteínas de membrana y de origen intracelular<sup>14</sup>. Al respecto, MALDI-TOF-MS es un método simple y seguro para analizar extractos de especies de *Legionella* ya que identifica las ocho especies más frecuentemente implicadas en

enfermedades humanas, incluyendo *Legionella pneumophila*<sup>11</sup>, ofrece una técnica de discriminación simple y rápida que podría ayudar en el seguimiento de los brotes de rápida propagación de este microorganismo.<sup>16</sup> Además tiene la ventaja del ahorro de costos, en comparación con la identificación basada en secuencia.<sup>18</sup>

## JUSTIFICACIÓN

La legionelosis es una enfermedad respiratoria; agente causal poco frecuente de la neumonía adquirida en la comunidad y ligeramente más frecuente en la neumonía hospitalaria. En la literatura internacional se menciona acerca del diagnóstico por diferentes metodologías desde secuenciación por biología molecular (lo más actual) hasta el medio de cultivo (método de referencia) en la detección de *Legionella pneumophila*; conociendo las características fisicoquímicas de esta bacteria y sus condiciones idóneas de temperatura (25 a 45°C) en su multiplicación, se propone evaluar utilizar algún tratamiento previo (en este caso, térmico) para aumentar el rendimiento en la recuperación de esta bacteria en los especímenes respiratorios de pacientes con neumonía sin germen aislado antes de su inoculación en medio de cultivo BCYE con la intención de determinar este efecto y también si es aplicable establecer un algoritmo que permita asegurar el aislamiento de este microorganismo en los especímenes respiratorios de un hospital de tercer nivel.

Desde la aparición del primer brote de la “enfermedad de los Legionarios” cuyo agente causal fue *Legionella pneumophila*, es conocido que esta bacteria tiene crecimiento lento (hasta 14 días) en medios de cultivos selectivos y/o diferenciales lo que se traduce en su aislamiento tardío y recuperación compleja. Para dar solución a estos eventos, fueron creados diferentes medios de cultivo enriquecidos con diferentes sustancias favorecedoras para su metabolismo y crecimiento; con el paso del tiempo fueron utilizados como método de referencia para su aislamiento e identificación ya que presentaban una sensibilidad variable en su

detección. La sensibilidad del cultivo en especímenes respiratorios oscila entre un 20 y un 80% y varía en función del tipo de espécimen, siendo la especificidad del 100%. Esta sensibilidad aparentemente disminuida podría estar influida por ciertas variables analíticas como por ejemplo, la presencia de más de un microorganismo en la muestra de estudio como interferente (utilización competitiva del sustrato para crecimiento microbiano); por las características intrínsecas termofílicas de algunas bacterias, la calidad de medio de cultivo así como los retrasos en el procesamiento de los especímenes respiratorios o el uso previo de las terapias antimicrobianas. Así es la razón de realizar un trabajo de éste tipo, identificar a *Legionella* como agente etiológico en especímenes bronquiales de pacientes con patología respiratoria (neumonía) a través de medios selectivos que puedan facilitar su identificación ya que es un microorganismo exigente.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Neumonía adquirida en la comunidad (NAC) ocurre en todo el mundo, es una de las principales causas de enfermedad y mortalidad. Para su diagnóstico se utiliza el cultivo de muestras respiratorias: esputo, secreción y/o lavado bronquial, cepillado broncoalveolar; siendo los gérmenes más frecuentemente aislados en la población general el *S. pneumoniae* (21-39%) seguido de *H. influenzae* (1.5-14%) y *Staphylococcus aureus* (0.8-8.7%), sin embargo, establecer el diagnóstico etiológico y realizar un tratamiento antibiótico adecuado resulta en muchas ocasiones una tarea complicada, debido a que existen otros microorganismos como *Legionella pneumophila* de difícil aislamiento ya que se ha encontrado como agente etiológico donde la prevalencia de la infección por este microorganismo oscila entre el 6 y el 13%, ocupando la segunda o tercera posición dentro de las causas de NAC bacterianas estudiadas en el ámbito hospitalario. Para la recuperación de esta bacteria el medio de cultivo es el método de referencia, proporciona un diagnóstico de confirmación de la infección causada por *Legionella* y en la mayoría de los laboratorios de microbiología esta búsqueda intencionada no se lleva a cabo.

La neumonía nosocomial (NN) es un proceso inflamatorio pulmonar de origen infeccioso; por su frecuencia la segunda infección de origen hospitalario, mientras que la neumonía asociada al ventilador (NAV) es la infección nosocomial más frecuente en la unidad de cuidados intensivos (UCI); ambas constituyen un problema tanto por su elevada morbilidad y mortalidad (sobre todo las causadas

por microorganismos multidrogo-resistentes y/o de difícil aislamiento), provocando incremento del consumo y gasto de los recursos sanitarios en los servicios de salud. Un aspecto importante es el costo del tratamiento empírico a los pacientes con infecciones intrahospitalarias en las UCI por lo cual resultaría más barato aislar el germen causal e instaurar una prueba diagnóstica complementaria que sea establecida de rutina; además, sería destacable conocer si en aquellos casos el microorganismo involucrado sea *Legionella pneumophila*.

## PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Es útil comparar el procesamiento térmico y enriquecimiento en la recuperación de *Legionella pneumophila* de especímenes bronquiales inoculados en el medio de cultivo BCYE para un mejor desarrollo bacteriano?

## HIPÓTESIS DE TRABAJO

La recuperación de *Legionella pneumophila* en especímenes bronquiales será del 50% al utilizar un procesamiento térmico y de enriquecimiento en el medio de cultivo BCYE.

## OBJETIVOS

**General:** Identificar si el procesamiento térmico y de enriquecimiento en el medio de cultivo BCYE en la recuperación de *Legionella pneumophila* de especímenes bronquiales

### **Específicos:**

- ✓ Identificar si el tratamiento térmico disminuye la biota saprofita de especímenes respiratorios inoculados en el medio de cultivo BCYE.
  
- ✓ Identificar si el enriquecimiento de los especímenes respiratorios ayuda al desarrollo de *Legionella pneumophila* en el medio de cultivo BCYE.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Diseño:** Transversal, prospectivo, comparativo, analítico.

**Universo de trabajo:** Especímenes bronquiales de pacientes hospitalizados y recibidos en el área de Microbiología Medica del Hospital General Dr. Gaudencio González Garza.

**Muestra:** Se utilizarán 40 especímenes de origen bronquial de pacientes ingresados en el Hospital General Dr. Gaudencio González Garza de acuerdo a los criterios de inclusión.

### **Criterios de Inclusión:**

- Género: Masculino o Femenino
- Edad: 18 años a 75 años
- Diagnostico de patología respiratoria o con sospecha diagnóstica relacionada como por ejemplo: Neumonía Comunitaria y/o Neumonía nosocomial, Neumonía asociada a ventilación, etc.
- Espécimen bronquial obtenido de secreción bronquial, aspirado y/o cepillado broncoalveolar.
- Especímenes bronquiales obtenidos en lapso <2 horas desde su colección hasta su procesamiento en el área de microbiología.
- Especímenes adecuadamente recolectados en frasco estéril, hermético, cerrado, a temperatura ambiente.

### **Criterios de Eliminación:**

- Especímenes diluidos con exceso de solución salina (>10 ml)
- Pérdida del espécimen por accidentes de laboratorio o en el traslado.

### **Criterios de No inclusión:**

- Especímenes no bronquiales.
- Especímenes colectados con más de dos horas desde su obtención.
- Diagnostico no relacionado al aparato respiratorio.
- Especímenes bronquiales inadecuadamente colectados (frasco no estéril, jeringas, de cánula de aspiración, etc.)
- Muestras inoculadas en medios de transporte.

**Análisis Estadístico.** Se utilizará estadística descriptiva como las medidas de tendencia central (media, mediana y/o moda) para la expresión de resultados.

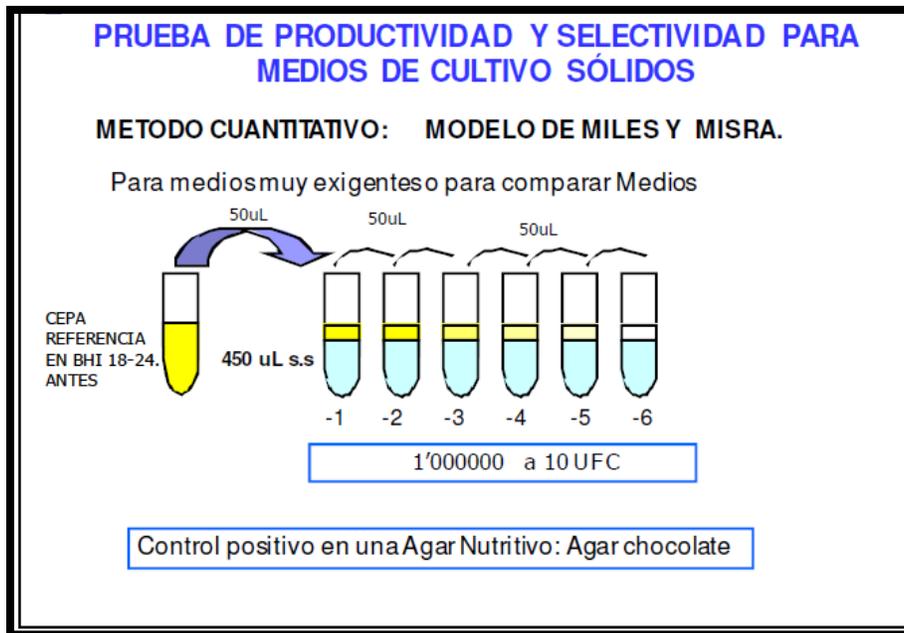
### **Variables**

<b>Nombre</b>	<b>Definición Conceptual</b>	<b>Definición Operacional</b>	<b>Tipo</b>	<b>Escala de Medición</b>
<b>Cultivo BCYE</b>	Agar de carbón tamponado y extracto de levadura que contiene 0,1% de alfa-cetoglutarato, es el medio base utilizado para la recuperación de Legionella a partir de muestras ambientales y clínicas.	Medio de Referencia y diagnostico	Cuantitativa	UFC/MI (>10,000)
<b>Descontaminación por Calor</b>	Sometimiento de las muestras a temperatura (50º C) durante 30 minutos	Procedimient o en la técnica de recuperación bacteriana.	Cuantitativa	Grados Celsius
<b>Especímenes bronquiales</b>	Aquellos líquidos y/o secreciones obtenidos del aparato respiratorio para el	Espécimen	Cualitativa/ cuantitativa	Presente o Ausente Numérica

apoyo diagnóstico de un paciente.				
<b>Productividad y selectividad del medio de cultivo</b>	Permite medir la capacidad de los medios de cultivo para favorecer el crecimiento y desarrollo de un microorganismo, esta característica se determina a través de la comparación que se realiza entre el medio por evaluar y un medio control.	Prueba Ecométrica	Cuantitativa	Numérica

La realización de este proyecto de investigación implica utilizar especímenes de los sujetos en estudio (secreción bronquial, aspirado y/o lavado bronquial) recibidas en el Servicio de Bacteriología del Hospital General UMAE Dr. Gaudencio González Garza del CMN la Raza durante el periodo de Agosto a Diciembre del presente año.

Para el aislamiento y crecimiento del microorganismo se utilizarán medios de cultivo BCYE en los cuales se inocularán los especímenes recolectados bajo diferentes procesos que se describirán más adelante. Se efectuara el control de calidad al medio de cultivo BCYE con la cepa control ATCC *Legionella pneumophila* 33152 sugerida por CLSI mediante el método ecométrico (modificado por Miles y Misra) con la finalidad de verificar su productividad y selectividad (Figuras 1 y 2).



**Figura 1. Método Ecométrico cuantitativo modificado de Miles y Misra** (Preparación de diluciones en tubo de ensayo). Inoculación de la cepa ATCC en caldo BHI en incubación durante 18-24 hrs; después, dispensar 50 microlitros de la cepa en BHI y homogeneizar en 450 microlitros de solución salina; tomar nuevamente 50 microlitros de la suspensión con solución salina y repetir sucesivamente en cada tubo de ensayo hasta obtener diluciones  $1 \times 10^6$  UFC/ml. Imagen: María Isabel Montoya Romero, Instituto Colombiano de Medicina Tropical.



**Figura 2. Método Ecométrico cuantitativo modificado de Miles y Misra.** Procesamiento en agar (placa). División del medio de cultivo en seis secciones iguales que representaran las diluciones previas realizadas en tubos de ensayo. Inocular 10 microlitros de la suspensión de cada dilución en cada sección correspondiente numerada y/o identificada y sembrado en estría por técnica de asa. Repetir mismo procedimiento en agar (placa) chocolate como control positivo. Imagen: María Isabel Montoya Romero, Instituto Colombiano de Medicina Tropical.

Durante los meses de Agosto a Diciembre de 2016, en la sección de Bacteriología Medica del Laboratorio Clínico del Hospital General UMAE “Dr. Gaudencio González Garza” CMN La Raza se utilizarán cuarenta especímenes de secreción y/o lavado bronquial de acuerdo a los criterios de inclusión con diagnóstico de patología respiratoria o sospecha diagnostica relacionada.

**Procesamiento de los especímenes.** El algoritmo de procesamiento en este proyecto involucra el ingreso de los especímenes al servicio de Bacteriología Medica del Hospital General Dr. Gaudencio González Garza mediante la asignación de folio interno y código de barras para su correcta identificación. Las muestras serán sometidas a diferentes procesamientos que se describen a continuación:

Grupo 1. Los especímenes serán centrifugados (en tubo cónico) a 1500 revoluciones por minuto (r.p.m.) y sembrados directamente en el medio de cultivo BCYE sin descontaminación térmica ni enriquecimiento previo.

Grupo 2. Especímenes centrifugados a 1500 rpm, se descontaminan por calor (en tubo cónico se introducen a baño maria a temperatura de 50°C durante 30 minutos) y se siembra por técnica de asa en medio de cultivo BCYE.

Grupo 3. Los especímenes serán centrifugados a 1500 rpm, luego se inoculan en medio de enriquecimiento con Tioglicolato durante 24 horas a 35°-37°C; después pasan a descontaminación térmica (en tubo cónico se introducen a baño maria a temperatura de 50°C durante 30 minutos) y posteriormente siembra por técnica de asa en medio de cultivo BCYE.

Grupo 4. Especímenes centrifugados a 1500 r.p.m. enseguida se descontaminan por calor (en tubo cónico se introducen a baño maria a temperatura de 50°C durante 30 minutos), después inoculación en medio de enriquecimiento con Tioglicolato durante 24 horas a 35-37°C y posterior siembra por técnica de asa en medio de cultivo BCYE.

Cabe destacar que cada grupo se conformará con diez especímenes bronquiales distribuidos consecutivamente para su procesamiento y la cepa *Legionella pneumophila* ATCC 33152 será evaluada en iguales condiciones para cada grupo descrito y posterior identificación en el equipo Maldi-tof (espectrometría de masas).

Una vez que las placas del medio de cultivo BCYE se incuben a 35°-37°C durante 24 horas, se procede a realización de Frotis para tinción de Gram, La revisión y lectura de las placas cultivo BCYE se realizaran a las 24 horas, 3, 7 y 14 días dependiendo del desarrollo colonial. El crecimiento colonial en el cultivo BCYE se identificara por medio del equipo Maldi-tof (espectrometrías de masas).

## RECURSOS, FINANCIAMIENTO Y FACTIBILIDAD

Recursos humanos:

- ❖ Un asesor principal, ubicado en el laboratorio, jefe de sección de bacteriología.
- ❖ Un médico residente de Patología clínica tercer año, encargado de vigilar la presencia de los especímenes bronquiales y su calidad, siembra y lecturas.

Además se realizará con el apoyo operativo del personal de salud asignado al servicio de Bacteriología Medica del Hospital General Dr. Gaudencio González Garza CMN La Raza; en relación a los insumos (medios de cultivo BCYE, portaobjetos, slider, tubos cónicos, etc.) serán utilizados conforme los recursos propios del laboratorio clínico. No requiere financiamiento.

## CONSIDERACIONES ÉTICAS

La metodología de este protocolo de investigación solo utiliza recursos materiales para efectuarse exitosamente; se rige por los principios básicos de la ética siguientes:

- ❖ Autonomía
- ❖ Ausencia de Engaño
- ❖ Consentimiento informado
- ❖ Confidencialidad
- ❖ Beneficencia
- ❖ Justicia

La investigación realizada en seres humanos de acuerdo a la Declaración de Helsinki puede emplear la observación o un procedimiento físico, químico o psicológico; puede también generar registros o archivos o hacer uso de registros existentes que contengan información biomédica o de otro tipo acerca de personas que pueden o no ser identificables a partir de esos registros o información. El uso de dichos archivos y la protección de la confidencialidad de los datos obtenidos de ellos se analizan en la obra ya citada *International Guidelines for Ethical Review of Epidemiological Studies* (CIOMS, 1991).

Para la realización de este protocolo de investigación se continuará con los lineamientos establecidos en el hospital para el ingreso de los pacientes como los siguientes documentos: consentimiento informado, procedimientos generales, anestésicos, fines quirúrgicos, transfusión de sangre y hemoderivados los cuales se encuentran en el expediente clínico de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM 004-SSA3-2012.

## CRONOGRAMA

Comparación del procesamiento térmico y enriquecimiento para la recuperación de *Legionella pneumophila* en especímenes bronquiales inoculados en el medio de cultivo BCYE

Actividades	Periodo de Investigación			
	Julio 2016	Julio-Agosto 2016	Agosto-Sept. 2016	Oct-Nov 2016
Revisión de la bibliografía y elaboración del protocolo				
Revisión conjunta asesor-residente				
Registro del protocolo en comité local de investigación				
Muestreo y recolección de datos				
Agrupación y análisis de datos				
Análisis de resultados				
Terminación e impresión				

## RESULTADOS

Se analizaron 42 especímenes –secreciones bronquiales- de pacientes de acuerdo a los criterios de inclusión; solo dos especímenes se eliminaron por ser obtenidas de aspirado traqueal. Los 40 especímenes restantes tuvieron una distribución equitativa de acuerdo al género (ver Figura 1).

La microbiota bacteriana aislada en el Grupo 1 sin descontaminación fue *Pseudomona aeruginosa* en el 34% y en el 25% no se encontró desarrollo bacteriano (ver Figura 2). En el grupo 2 sometido a descontaminación térmica se aisló en el 17% de los especímenes a *S. aureus* y el 25% sin desarrollo bacteriano (ver figura 3). El grupo 3 enriquecido con Tioglicolato 24 horas y tratamiento térmico permitió el aislamiento hasta en el 25% de *P. aeruginosa* y un 17% no se obtuvo crecimiento bacteriano (ver figura 4). Por último, en el grupo 4 con tratamiento térmico y luego enriquecimiento con Tioglicolato durante 24 horas se encontró un 40% de especímenes sin crecimiento y se aisló en un 20% a *S. epidermidis* (ver figura 5). Todos los especímenes fueron procesados para identificación mediante el equipo Maldi-tof (espectrometrías de masas) y en un solo caso no se logró la identificación aún por duplicado. En ningún grupo de todos los especímenes estudiados se aisló *Legionella pneumophila*.

Se realizó una comparación estadística entre los diferentes grupos de tratamiento con respecto al número de microorganismos aislados (prueba de Kruskal-Wallis y post-hoc de Dunn) encontrándose una diferencia estadísticamente significativa

entre el grupo 1 y 4 ( $p=0.03$ ), al comparar a los demás grupos no se encontró diferencia estadísticamente significativa (ver figura 6).

En relación al tiempo del desarrollo bacteriano, solo fueron incluidos los especímenes con crecimiento positivo. Se aplicó el Test de Wilcoxon entre los grupos sin encontrar diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.5000$ ; figura 7).

Para el control de calidad del medio de cultivo BCYE se realizó Prueba Ecométrica con la cepa control ATCC *Legionella pneumophila* 33152 sugerida por CLSI con la finalidad de verificar su productividad y selectividad, obteniendo la presencia de crecimiento bacteriano hasta la dilución  $1 \times 10^5$  UFC/ml; sin embargo, no se logró calcular la razón de productividad/selectividad debido a que en el medio de control positivo (agar chocolate) no hubo desarrollo de esta cepa (ver Figura 8). Se utilizó el equipo Maldi-tof para la identificación de la cepa ATCC *Legionella pneumophila* 33152 reportándose correcta con un nivel de confianza del 99.9%.

Se sometió la cepa ATCC *Legionella pneumophila* 33152 a los diferentes grupos ya descritos en los cuales se obtuvo crecimiento bacteriano en los grupos 1 a las 24 hrs y grupo 2 a las 48 hrs posterior a inoculación en el medio de cultivo BCYE, sin embargo, no hubo crecimiento en los grupos 3 y 4 los cuales tenían medio de enriquecimiento Tioglicolato (ver Figura 9). Para la recuperación y desarrollo de esta cepa control también se inoculó en medio de cultivo BHI (Infusión cerebro-corazón) en el cual se verificó crecimiento posterior a las 24 hrs en el medio de cultivo BCYE.

## GRAFICAS

Figura 1. Especimenes bronquiales de pacientes hospitalizados en el HG UMAE Dr Gaudencio Gonzalez CMN La Raza

■ Femenino ■ Masculino

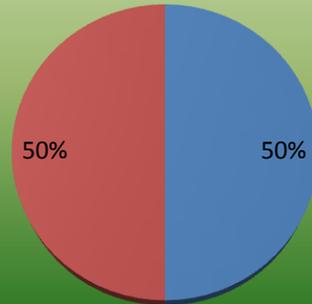
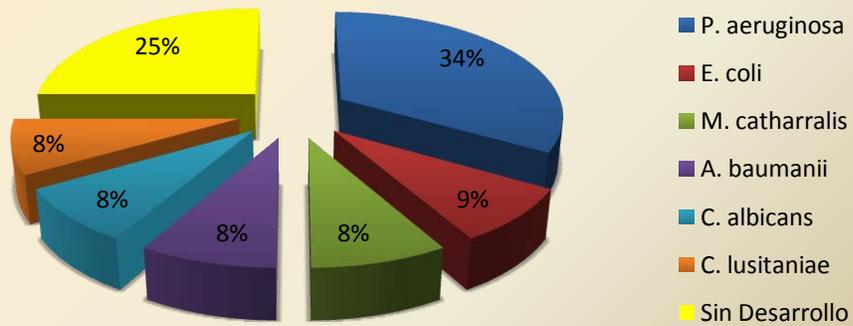
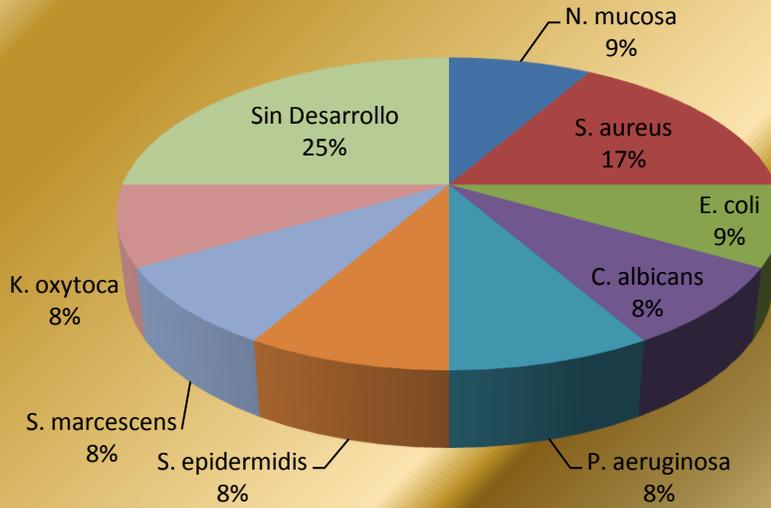


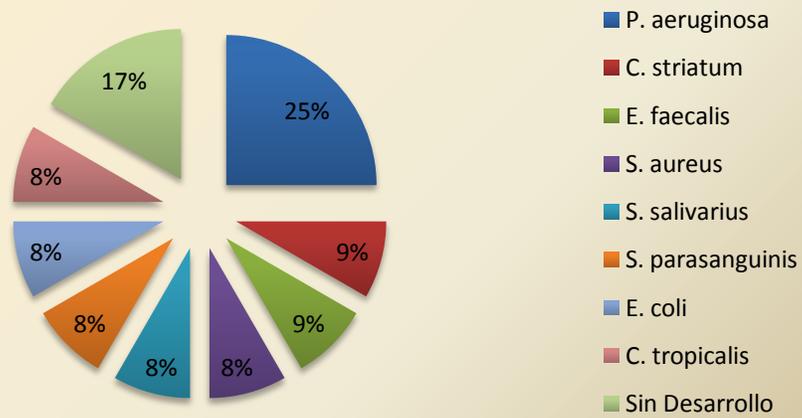
Figura 2. Frecuencia de microorganismos inoculados directamente en el medio de cultivo BCYE



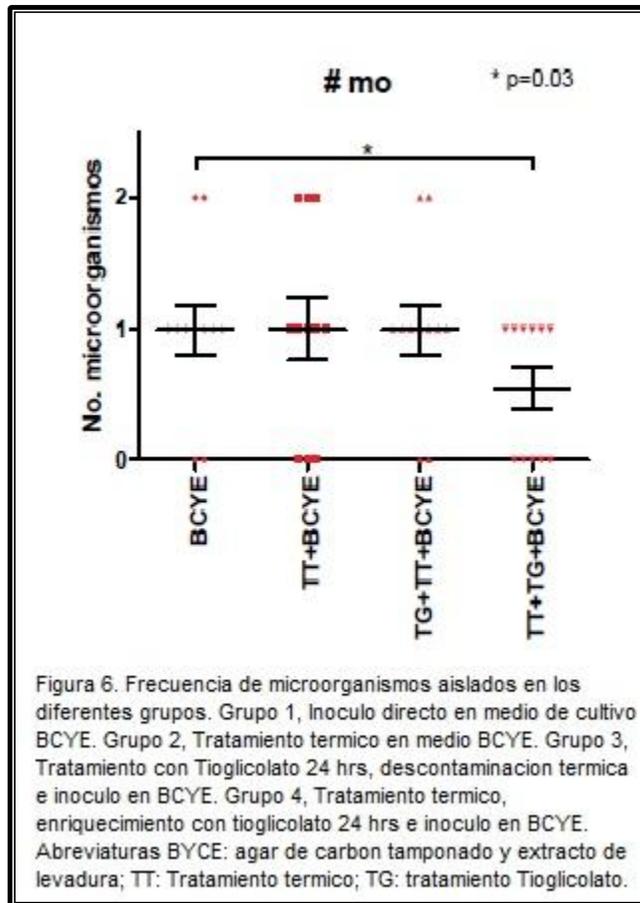
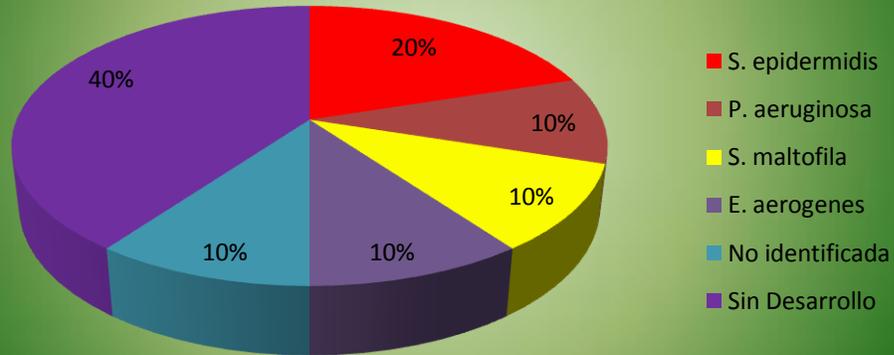
**Figura 3. Frecuencia de microorganismos sometidos a Descontaminacion termica e inoculados en el medio de cultivo BCYE.**



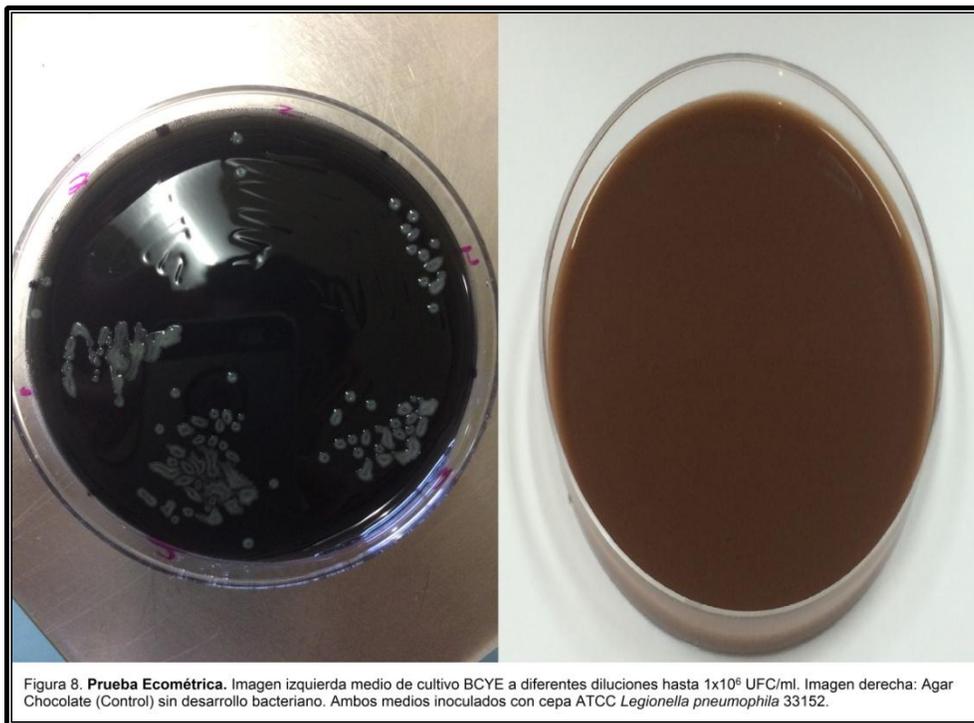
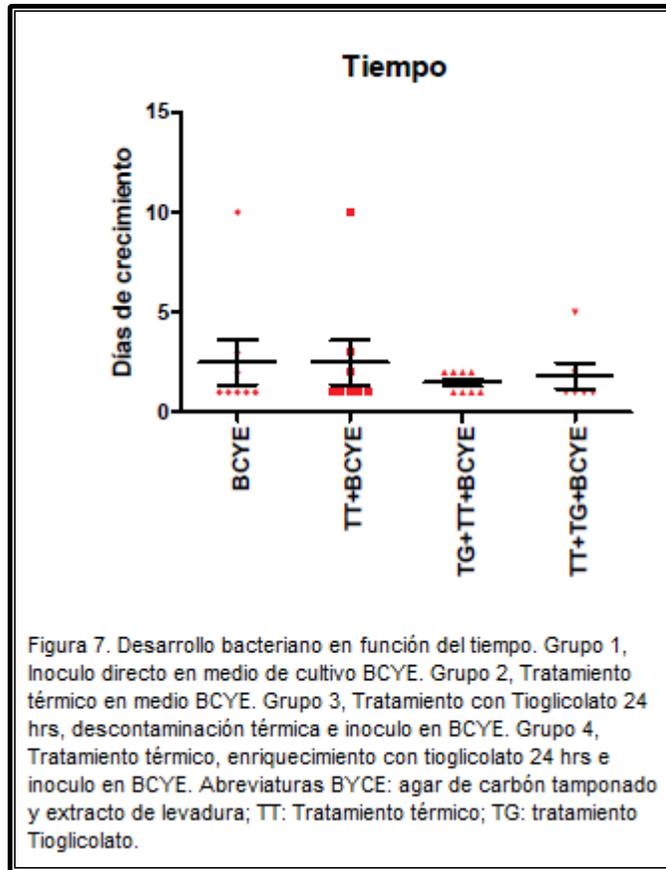
**Figura 4. Frecuencia de microorganismos sometidos a enriquecimiento con Tioglicolato por 24 horas y despues descontaminacion termica inoculados en el medio de cultivo BCYE.**



**Figura 5. Frecuencia de microorganismos sometidos a descontaminación termica, luego a enriquecimiento con Tioglicolato por 24 horas e inoculados en el medio de cultivo BCYE**



**Figura 6. Frecuencia de microorganismos aislados en los diferentes grupos. Grupo 1, Inoculo directo en medio de cultivo BCYE. Grupo 2, Tratamiento termico en medio BCYE. Grupo 3, Tratamiento con Tioglicolato 24 hrs, descontaminación termica e inoculo en BCYE. Grupo 4, Tratamiento termico, enriquecimiento con tioglicolato 24 hrs e inoculo en BCYE. Abreviaturas BCYE: agar de carbon tamponado y extracto de levadura; TT: Tratamiento termico; TG: tratamiento Tioglicolato.**



CONTROL	BCYE	TT+BCYE	TG+TT+BCYE	TT+TG+BCYE
Legionella pneumophila Cepa ATCC 33152	Positivo a las 24 hrs	Positivo a las 48 hrs	Negativo	Negativo

Figura 9. Crecimiento bacteriano del microorganismo control. BCYE: agar de carbon tamponado y extracto de levadura; TT: Tratamiento termico; TG: tratamiento Tioglicolato.

## DISCUSIÓN

Lee et al<sup>19</sup> describe a *Legionella pneumophila* como un agente bacteriano que compite pobremente con la microbiota orofaríngea por lo cual se requiere el uso de medios especializados que contengan suplementos nutricionales y carbón tamponado como el medio de cultivo BCYE; nuestro estudio involucró utilizar este medio con pre-tratamiento térmico y/o enriquecimiento de los especímenes para un mejor aislamiento bacteriano.

Los primeros estudios realizados en los años 80's por Groothuis and Veenendaal<sup>20</sup> acerca del aislamiento de *Legionella* a partir de muestras clínicas y ambientales se basaron en investigar el efecto del tratamiento térmico sobre las muestras clínicas y de agua concentradas por filtración. Se evidencio que este tratamiento térmico de las muestras durante 30 minutos a 50°C redujo el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) de la microbiota acompañante por un factor  $10^{1.6}$ - $10^{3.9}$  en función del número de contaminantes, mientras que el número de UFC de *Legionella* sólo se redujo por un factor 1,05 a 1,44. Nuestro estudio utilizó el tratamiento térmico en similares condiciones por ser más barato y se comparo en conjunto con el enriquecimiento en Tioglicolato. Una desventaja fue la ausencia de *Legionella pneumophila* en nuestros especímenes bronquiales.

Un estudio realizado en Italia en el año 2000 por Leoni y Legnani<sup>21</sup> sobre la inoculación directa de muestras de agua y con pretratamiento térmico demostró una frecuencia más alta de recuperación de *Legionella* en muestras

descontaminadas con calor; al respecto, nuestros resultados difieren al encontrar una frecuencia similar de microbiota normal, mas oportunista y/o emergente en los especímenes inoculados directamente y los sometidos al tratamiento térmico en comparación con la disminución de microorganismos al utilizar en conjunto el tratamiento térmico además del enriquecimiento con tioglicolato. En relación a la cepa control ATCC *Legionella pneumophila* 33152, se observo un comportamiento similar a lo descrito por estos autores acerca de la subestimación del numero de UFC de *Legionella* (mayor en inoculación directa que en la descontaminación térmica).

Fujinami et al<sup>16</sup> encontró que la técnica de MALDI-TOF MS demuestra una alta discriminación de especies de *Legionella* al igual que la electroforesis en gel de campo pulsado. Gaia et al<sup>18</sup> encontró que, con la creación de una base de datos de aislamientos de *Legionella* con varios espectros para cada especie (SuperSpectra), el método MALDI-TOF MS podría ser fiable para la identificación de especies de *Legionella*; sin embargo, en un estudio realizado en Dinamarca por Svarrer y Uldum<sup>22</sup> comentan que el MALDI-TOF MS todavía no ha sido ampliamente utilizado como un método de identificación para las especies de *Legionella*. A este respecto, nuestra cepa control ATCC tuvo un nivel de confianza del 99.9% al realizarse la identificación por esta tecnología.

Gaia et al<sup>18</sup> encontró que la base de datos de MALDI-TOF MS necesita ser actualizada con más especies de *Legionella*, y preferiblemente varios aislados de cada especie, idóneos para su uso como un método rutinario para la identificación de *Legionella*. Con una base de datos optimizada, MALDI-TOF MS podría ser

capaz de reemplazar a la secuenciación, al menos para la identificación de rutina en un hospital de tercer nivel, no obstante, para la identificación final de especies, todavía se prefieren los métodos basados en el ADN.

## CONCLUSIONES

Se encontró una microbiota normal; con mayor frecuencia oportunista y emergente, lo cual es esperado por las diversas entidades clínicas de los pacientes referidos a un hospital de tercer nivel; en relación a esto, se evidencia que la simple inoculación en el medio de cultivo para el procesamiento de los especímenes no es suficiente para erradicar a la microbiota saprofita; incluso combinando ambos procesos (térmico y enriquecimiento) es factible encontrarlos, pudiera estar implicado las condiciones per se de los pacientes, las cuales no fueron evaluadas en este estudio.

Los resultados obtenidos revelan una disminución de la microbiota al procesar los especímenes en tratamiento térmico y posterior enriquecimiento con tioglicolato durante 24 horas respecto a la inoculación directa; sin embargo, es probable que si la búsqueda es intencionada para el aislamiento de *Legionella pneumophila* sea preferible un medio de enriquecimiento diferente como el caldo nutritivo BHI agregado al tratamiento térmico previo de los especímenes a estudiar. Este trabajo compara la utilidad del tratamiento térmico versus enriquecimiento lo cual demuestra que estos, en conjunto, impiden un mayor desarrollo en el número de microorganismos respecto a los estudios previos con tratamiento térmico exclusivo. De acuerdo a nuestros resultados se propone un algoritmo de procesamiento interno diferente que sea el comienzo de nueva línea de investigación para el aislamiento de *Legionella pneumophila*: el uso de tratamiento térmico durante 30 minutos a 50°C y posterior enriquecimiento con caldo nutritivo BHI bajo una sospecha diagnóstica manifiesta.

## BIBLIOGRAFIA

1. Compañ DD, Zúñiga CI, Caro LJ, Ávila CJ. Legionelosis, una enfermedad olvidada en México. Rev Enferm Infecc Ped 2011: 39-42
2. Sabria M. *Legionella pneumophila* serogrupo 1. Enferm Infecc Microbiol Clin 2003; 21(8):391-393.
3. Ulloa FM. *Legionella pneumophila*. Rev Chil Infect 2008; 25 (3): 208
4. Legionelas, bartonelas y bacterias patógenas poco comunes. En: Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Microbiología Médica. 25ª Edición. 2010. p. 281-284.
5. Gea-Izquierdo E, Mezones-Holguin E, Haro-Garcia L. Acciones de prevención y control de la legionelosis: un reto para la salud pública española. Rev Perú Med Exp Salud Pública. 2012; 29(2):272-276.
6. Ausina V, Catalán V. Cercenado E. Pelaz C. Procedimientos en microbiología clínica. Diagnostico microbiológico y control de la Legionelosis. 2005. (consultado en 2016 Marzo). Disponible en <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos>.
7. Procedures for the Recovery of *Legionella* from the Environment. U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Atlanta, GA. January, 2005.(consultado 2016 Marzo). Disponible en <http://www.cdc.gov/legionella/health-depts/inv-tools-cluster/lab-inv-tools/procedures-manual>.

8. BBL BYCE Agar. L007349. Rev 07. Febrero 2007. (consultado en 2016 Marzo). Disponible en <https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets>
9. Rodríguez E, Gamboa MM, Arias ML. Legionella spp. ¿Ausente en los hospitales de Costa Rica? Rev Biomed 2002; 13:165-169.
10. Legionella. En: Schaub I, Kathleen M. Diagnostico microbiológico de Bailey y Scott. 11ª Edición. pp. 502-506.
11. Seng P. Rolain JM. Fournier PE. La Scola B. Drancourt M. Raoult D. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology Future Microbiol 2010 5(11): 1733–1754.
12. Rivero CI. Grupo de Patología Infecciosa AEPap. Test de detección rápida de Legionella. Febrero 2014. Disponible en <http://www.aepap.org/grupos/grupo-de-patologiainfecciosa/contenido>
13. iQ-Check Legionella Real-Time PCR kits. Bio-Rad (Actualizado 2015 Mayo 10; consultado 2016 Marzo). Disponible en <http://www.bio-rad.com/es-es/product/iq-check-legionella-real-time-pcr-kits>.
14. March GA. Eiros JM. Impacto de la metodología Malditof en la identificación clínica de agentes infecciosos. Rev Electron Biomed/Electron J Biomed 2012; 1:60-65.
15. Descours G. Cassier P. Forey F. Ginevra C. Etienne J. Lina G. et al. Evaluation of BMPA, MWY, GVPC and BCYE media for the isolation of Legionella species from respiratory samples. Journal of Microbiological Methods 98 (2014): 119–121.
16. Fujinami Y. Kikkawa HS. Kurosaki Y. Sakurada K. Yoshino M. Yasuda J. Rapid discrimination of Legionella by matrix-assisted laser desorption

- ionization time-of-flight mass spectrometry *Microbiological Research* 166 (2011): 77-86.
17. Casati S. Conza L. Bruin J. Gaia V. Compost facilities as a reservoir of *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species. *Clinical Microbiology and Infection*, 2010, 16 (7): 945-947.
  18. Gaia V. Casati S. Tonolla M. Rapid identification of *Legionella* spp. by MALDI-TOF MS based protein mass fingerprinting. *Systematic and Applied Microbiology*, 2011, 34 (1): 40-44.
  19. Lee T. Vickers R. Yu V. Wagener M. Growth of 28 *Legionella* species on selective culture media: a Comparative study. *J. Clin. Microbiol.* 1993, 31 (10): 2764-2768.
  20. Groothuis D. Veenendaal H. Heat treatment as an aid for the isolation of *Legionella pneumophila* from Clinical and environmental samples. *Medizinische Mikrobiologie*. 1983, 255 (1): 39-43.
  21. Leoni E. Legnani P. Comparison of selective procedures for isolation and enumeration of *Legionella* species from hot water systems. *Journal of Applied Microbiology*, 200, 90: 27-33.
  22. Svarrer W. Uldum S. The occurrence of *Legionella* species other than *Legionella pneumophila* in clinical and environmental samples in Denmark identified by mip gene sequencing and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 1004–1009.