



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“Revisión y actualización de la literatura
sobre *Legionella pneumophila*”**

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

NALLELY CONCEPCIÓN JUÁREZ SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESINA: M. en C. ARTURO CALDERÓN VEGA



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO, 2013



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 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.

DEDICATORIAS

A Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante toda mi vida.

A mis padres, quienes son las personas que más amo en el mundo y las personas que siempre han estado a mi lado incondicionalmente y son el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como en la vida, por su incondicional apoyo a través del tiempo, gracias a mi mami Elizabeth Sánchez Márquez, por darme la vida, quererme mucho, creer en mí y apoyarme siempre. Mamá gracias por ser más que mi madre, por ser mi mejor amiga, aconsejarme, consentirme y ser lo mejor de mi vida te amo.

A mi papá Abel Juárez Torres porque eres la persona que más admiro, gracias por darme la educación que me diste y por siempre tener las palabras correctas cuando más lo necesito, agradezco a la vida y a Dios de que tú seas mi papá y formes parte de mi vida te amo mucho gracias por todo papi, sin ti esto no hubiera sido posible.

A mis hermanas Gabriela Elizabeth y Tania Haide, por estar conmigo siempre, ser mis cómplices y mis amigas, este esfuerzo también es suyo, gracias por creer en mí las amo mucho.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de México por haberme abierto las puertas a su seno científico, para poder estudiar mi carrera, así como también a los diferentes docentes que me brindaron sus conocimientos y su apoyo para seguir adelante día a día.

A mi asesor de tesina el M. en C. Arturo Calderón Vega, por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico y quien estuvo a mi lado siempre que lo necesité, siempre con mucha paciencia asesorándome y dándome siempre ánimos para seguir.

A mis sinodales de tesina Dra. Elvia Manuela Gallegos Neyra, quien siempre estuvo al pendiente de mi avance y mi tesina y al igual que el M. en C. Arturo me impulsaba a seguir, a la M. en C. María de los Ángeles Espinoza, quien en nuestras pláticas me enseñó que haga lo que haga siempre lo realice pensando en mí y en mi felicidad, a la M. en C. María Dolores Hernández Martínez y a la Biol. Blanca Nieves Martínez Rodríguez, quienes me apoyaron para que este proyecto pudiera concluir.

Agradezco también a todos mis compañeros y amigos de la universidad por estar siempre a mi lado y formar parte de mi vida sin ustedes no lo hubiera logrado, Tania (China), te adoro mucho todas nuestras pláticas y tus consejos me hacen seguir día a día sabiendo que existes en mi vida, Jair, eres como el hermano que nunca tuve y sé que puedo contar contigo siempre porque eres de esas personas que siempre estarán ahí para mí pase lo que pase te quiero muchísimo, Eduardo, sé que tu amistad es incondicional, gracias por todos los momentos vividos te quiero, Navid, las alegrías que pasamos juntas y todas nuestras pláticas sin fin, hizo que entre nosotras existiría una gran confianza y una gran amistad te adoro mucho chamaquita, todos ustedes son una parte súper importante de mi mundo y nuestra amistad es mágica y pase lo que pase estaremos juntos siempre porque yo hice un pacto con la vida y ese pacto es que todos ustedes formen parte de ella siempre los amo mucho.

A mi mejor amigo y que al mismo tiempo es el amor de mi vida: Edgar, gracias por creer en mí y estar a mi lado siempre, porque tú eres lo que le da sentido a todo y el que me hace seguir adelante, eres mi mayor impulso, contigo soy mejor persona, te amo demasiado gracias por todo mi amor.

“Y por último, deseo dedicar este momento; a mí misma, por no dejarme vencer, ya que en ocasiones el principal obstáculo se encuentra dentro de uno...”

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN

1.1. <i>Legionella pneumophila</i> y otras legionelas.....	7
1.2. Historia.....	10
2. ANTECEDENTES.....	13
3. DESCRIPCIÓN.....	16
3.1. Morfología y fisiología de <i>Legionella</i> (microorganismos típicos).....	16
3.2. Cultivo (características de crecimiento).....	18
4. BIOLOGÍA Y ECOLOGÍA DE LA BACTERIA.....	21
4.1. Hábitat.....	21
4.2. Ciclo de vida de <i>Legionella pneumophila</i>	22
4.2.1 Modo de infección.....	23
4.2.2 La invasión celular de <i>Legionella</i>	24
4.2.3 Internalización y crecimiento celular.....	25
4.2.4 Fin de la replicación y la salida.....	26
4.3. Biopelículas y <i>Legionella pneumophila</i> en el ambiente.....	28
4.4. Factores físico-químicos que favorecen el crecimiento de <i>Legionella</i> spp. en el ambiente.....	28
4.5. Invasión de protozoos por <i>Legionella</i> spp.....	31
5. Patogenicidad de <i>Legionella</i>.....	36
5.1. Patogenia.....	36
5.2. Descripción de las enfermedades que provoca <i>Legionella</i> spp.....	37
5.3. Agentes etiológicos.....	38
5.4. Síntomas de las enfermedades en el humano.....	39
5.5. Datos clínicos.....	40
6. INMUNOLOGÍA.....	43
7. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS.....	45
7.1. Inmunofluorescencia directa.....	45

7.2. Serología.....	46
7.3. Antígeno urinario.....	46
7.4. Detección de DNA de <i>Legionella</i> spp. por PCR.....	47
8. TRATAMIENTO CLÍNICO.....	50
9. EPIDEMIOLOGÍA.....	52
10. PREVENCIÓN Y CONTROL.....	55
 BIBLIOGRAFIA.....	 58

FIGURAS

Figura 1. <i>Legionella pneumophila</i> de 2µm con flagelo, el cual le proporciona movilidad.....	16
Figura 2. Efecto de la temperatura sobre el desarrollo de las bacterias del género <i>Legionella</i>	18
Figura 3. <i>Legionella</i> con apariencia de “cristal tallado” y el centro de la colonia delimitado con un círculo purpura.....	20
Figura 4. Ciclo de vida ambiental de <i>Legionella pneumophila</i> dentro de los protozoos.....	26
Figura 5. Formación de biopelícula.....	28
Figura 6. <i>Acanthamoeba</i> trofozoíto.....	33
Figura 7. Modelo conceptual de inhalación de <i>Legionella</i> desde aerosoles de las regaderas.....	42
Figura 8. Esquema de la cadena epidemiológica de la enfermedad del legionario.....	53

CUADROS

Cuadro.1 Especies de <i>Legionella</i> con sus serogrupos y su patogénesis en humanos.....	7
Cuadro 2. Condiciones favorables a la proliferación de <i>Legionella</i>	29
Cuadro 3. Instalaciones con mayor, menor y riesgo de proliferación de <i>Legionella</i>	30
Cuadro 4. Protocolo de desinfección del agua en caso de brote.....	57

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Legionella pneumophila* y otras legionelas

Las especies del género *Legionella* son bacterias aeróbicas, Gram-negativas, no formadoras de esporas, en forma de varilla. Tienen un metabolismo no fermentador, y requieren de L-cisteína y sales de hierro para su crecimiento. Se han colocado en la familia *Legionellaceae*, que contiene solo el género *Legionella* (Riffard *et al.*, 1998).

Las bacterias patógenas del género *Legionella* spp. son transmitidas por el agua, el género incluye 52 especies y 71 serogrupos distintos, (SG). (<http://www.bacterio.cict.fr/l/legionella.html>. last accessed on 17 June 2010). (Bargellini *et al.*, 2010).

Cuadro.1 Especies de *Legionella* con sus serogrupos y su patogénesis en humanos. (+a), ha sido relacionada con infecciones humanas (-), no se conoce aislados a partir de infecciones humanas; (+b), presuntamente relaciona con infecciones en humanos.

Especies de <i>Legionella</i>	No. de serogrupos	Patogenicidad en seres humanos ^a
<i>L. adelaidensis</i>	1	-
<i>L. anisa</i>	1	+
<i>L. beliardensis</i>	1	-
<i>L. birminghamensis</i>	1	+
<i>L. bozemanii</i>	2	+
<i>L. brunensis</i>	1	-
<i>L. busanensis</i>	1	-
<i>L. cherrii</i>	1	-
<i>L. cincinnatiensis</i>	1	+
<i>L. drankourtii</i>	1	-
<i>L. drozanskii</i>	1	-
<i>L. dumoffi</i>	1	+
<i>L. erytra</i>	2	+
<i>L. fairfieldensis</i>	1	-
<i>L. fallonii</i>	1	-
<i>L. feeleii</i>	2	+
<i>L. geestiana</i>	1	-
<i>L. gormanii</i>	1	+
<i>L. gratiana</i>	1	-
<i>L. gresilensis</i>	1	-
<i>L. hackeliae</i>	2	+
<i>L. impletisoli</i>	1	-

<i>L. israelensis</i>	1	-
<i>L. jamestowniensis</i>	1	-
<i>L. jordanis</i>	1	+
<i>L. lansingensis</i>	1	+
<i>L. londiniensis</i>	2	-
<i>L. longbeachae</i>	2	+
<i>L. lytica</i>	1	+
<i>L. maceachemii</i>	1	+
<i>L. micdadei</i>	1	+
<i>L. moravica</i>	1	-
<i>L. nautarum</i>	1	-
<i>L. oakridgensis</i>	1	+
<i>L. parisienses</i>	1	+
<i>L. pneumophila</i>	16	+
<i>L. quateirensis</i>	1	-
<i>L. quinlivanii</i>	2	+ ^b
<i>L. rowbothamii</i>	1	-
<i>L. rubrilucens</i>	1	+ ^b
<i>L. sainthelensi</i>	2	+
<i>L. santicrucis</i>	1	-
<i>L. shakespearei</i>	1	-
<i>L. spiritensis</i>	2	-
<i>L. steigeewaltii</i>	1	-
<i>L. taurinensis</i>	1	-
<i>L. tucsonensis</i>	1	+
<i>L. wadsworthii</i>	1	+
<i>L. waltersii</i>	1	+
<i>L. worsleiensis</i>	1	+ ^b
<i>L. yabuuchiae</i>	1	-

A temperaturas entre 20 y 50 °C, *Legionella* spp. coloniza frecuentemente los sistemas de distribución de agua; la presencia de sedimentos, lodos, sarro, moho y otros materiales dentro del sistema, junto con biopelículas, se cree que juegan un papel importante en albergar y proporcionar condiciones favorables para que la bacteria *Legionella* pueda crecer (EWGLI 2005; Bargellini *et al.*, 2010).

La infección con especies de *Legionella* se produce a través de la inhalación de aerosoles generados a partir de una solución contaminada o por la aspiración de agua contaminada del medio ambiente. (Fields *et al.*, 2002). La manifestación clínica predominante de la infección por *Legionella* es la neumonía. Aproximadamente el 85 % de los casos de legionelosis se deben a *L. pneumophila*, con aproximadamente 50 % de toda la enfermedad

debida a *L. pneumophila* serogrupo 1 y 10 % a serogrupo 6 (Reingold *et al.*, 1984; Dowling *et al.*, 1992).

Aunque otras especies de legionelas son también patógenos potenciales en humanos (Fields *et al.*, 2002; Edagawa *et al.*, 2008); la epidemiología varía en las diferentes regiones y la neumonía puede ser causada por *Legionella* spp; *L. longbeachae*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii* y *L. micdadei* (Blyth *et al.*, 2009). No está claro si esta distribución se debe a una mayor virulencia inherente de las cepas más frecuentemente aisladas o, más probablemente, a la prevalencia de las distintas cepas en el medio ambiente (Dowling *et al.*, 1992).

Se ha reconocido que la emergencia de legionelosis en la última mitad del siglo ha ocurrido dentro de un ambiente de incremento en los estándares de calidad de agua potable (USEPA, 2000). La mayoría de las infecciones humanas provocadas por especies, que no son *L. pneumophila*, no son neumónicas y aparecen después de la exposición a *Legionella*. Los casos de infecciones provocadas por especies diferentes a *L. pneumophila* son debido a: *L. micdadei* (60 %), *L. bozeemanii* (15%), *L. dumoffii* (10 %), *L. longbeachae* (5 %) y otras especies (10 %) (Fang, 1989).

Legionella longbeachae se ha asociado a la exposición con el abono vegetal en Australia, los Estados Unidos y Japón (Steele *et al.*, 1990). Los mecanismos de infección por medio del abono vegetal no se han comprendido totalmente. Los brotes de legionelosis asociados a la construcción o al mantenimiento se cree que es el resultado del desecho del abandono de biopelículas (las matrices fangosas producidas e inhabilitadas por bacterias, las cuales les permiten adherirse a la superficie) o la eliminación de la carga de óxido de los sistemas de tuberías provocado por los cambios en el flujo o la presión del agua (Storey *et al.*, 2004). Recientemente, se sugirió que había un espectro de enfermedades provenientes de una fuente individual y varios brotes de la enfermedad del Legionario y de la fiebre de Pontiac.

En condiciones apropiadas, la mayoría de la *Legionella* que crece en temperaturas corporales puede provocar infecciones humanas (Fields, 1996). Las infecciones provocadas por otras especies diferentes a la *L. pneumophila* podrían no ser detectadas debido a la falta de pruebas de diagnóstico aprobadas (Fields *et al.*, 2002).

El solo conteo de *Legionella* no puede usarse para predecir un foco positivo para que la bacteria produzca la infección. La probabilidad de que un foco provoque la infección depende de muchos factores, como por ejemplo, la carga bacteriana, la eficacia de la difusión, la manera en que la bacteria se multiplica y la capacidad del foco para formar aerosoles.

Legionella produce una neumonía severa que generalmente se reporta como brotes epidémicos con más de 100,000 casos por año, esto en los Estados Unidos (CDC, 2005). En otras partes del mundo la casuística es semejante, sin embargo, en México no se ha reportado ningún caso de legionelosis en donde se demuestre el aislamiento del patógeno a pesar de que existen las condiciones para que la bacterias pueda crecer de manera abundante en muchos lugares (Villaseñor *et al.*, 2005). Es por eso que la finalidad de este trabajo es dar a conocer información acerca de *Legionella* y sus consecuencias al no ser tratada como se debe ya que también causa una enfermedad aguda, enfermedad febril, no neumónica conocida como fiebre de Pontiac (Dowling *et al.*, 1992); que en muchas ocasiones es confundida con una gripe, ya que los síntomas son similares.

1.2. HISTORIA

El primer brote de la enfermedad del legionario ocurrió en Austin, Minnesota, en el verano de 1957 (Osterholm *et at.*, 1983; Edelstein *et al.*, 2008). Setenta y ocho personas en esa pequeña ciudad de aproximadamente 30,000 personas, desarrollaron neumonía entre junio y agosto. La terapia con antibióticos no tuvo ningún beneficio aparente, pero el 97 % de las personas afectadas se recuperaron entre 2 a 14 días después de la aparición de la enfermedad. El origen de la epidemia nunca se determinó, y la neumonía no se repitió en los años siguientes. El misterio de la causa de la epidemia fue resuelto por la investigación de los supervivientes 22 años después. Esto demostró que los supervivientes habían elevado significativamente sus anticuerpos para *Legionella pneumophila* en comparación con los controles pareados. Debido a que empleados y no empleado de la planta de empaque se enfermaron. Lo más probable es que la epidemia se derivó de una torre de refrigeración.

Posteriormente en Washington DC. en julio y agosto de 1965, una epidemia de una enfermedad respiratoria severa caracterizada por la abrupta aparición de fiebre alta, debilidad, malestar, y tos no productiva, frecuentemente acompañada por evidencias radiográficas de neumonía, afecto al menos a 81 personas en el hospital psiquiátrico de St. Elizabeth. De los pacientes afectados 14 de ellos (17 %) murieron (Thacker, 1987). En esa ocasión a pesar de realizar intensivas pruebas de laboratorio no se pudo determinar su etiología.

Tres años más tarde también en Estados Unidos, en un edificio de Oakland country Health Department, se produjo un nuevo brote de infección respiratoria que afecto al 95 % de los trabajadores, sin llegar a producir mortalidad. Esta variante conocida ahora como fiebre de Pontiac, afecto a 95 de cada 100 trabajadores y 49 de 170 visitantes se enfermaron. Tres investigadores del Center for Disease Control (CDC) fueron enviados al interior del edificio y se enfermaron. Más tarde ellos fueron reemplazados por otros tres investigadores que también se enfermaron. El problema se remontó a un condensador evaporativo del sótano.

Un brote inusual de neumonía grave entre los participantes de una convención de la Legión Americana en Filadelfia en 1976 dio lugar a la descripción de la enfermedad del legionario. Entre 221 personas que contrajeron la enfermedad, 34 (15 %) fallecieron posteriormente (Maiwald *et al.*, 1998).

En 1977, dos científicos del Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, lograron identificar que la enfermedad era producida por un nuevo tipo de bacteria que hasta ese momento no había sido identificada. Se logró aislar el microorganismo patógeno, al cual se denominó *Legionella pneumophila*, por los pacientes afectados que eran excombatientes legionarios y del vocablo griego pneumo, pulmón y philos, amante.

Sus descubridores fueron los bacteriólogos Charles C. Sherland, un experto en lepra y Joseph E. Mc Dade, especializado en rickettsias, otro tipo de bacterias. Lo interesante del problema es que ambos especialistas parecen haber comprobado que la enfermedad no era en absoluto nueva. Sucesivas investigaciones han podido comprobar que esta bacteria estaría produciendo más de 70 mil casos de neumonía cada año en los Estados Unidos.

Su inclusión en una nueva familia bacteriana fue propuesta en el Primer Simposio Internacional sobre Enfermedad del legionario en Atlanta, Estados Unidos, en Noviembre de 1978.

Desde que el descubrimiento inicial del brote de legionelosis en Filadelfia fue causado por *Legionella* a partir de un sistema de aire acondicionado del hotel, ha habido una relación evidente con las aguas ambientales. *L. pneumophila* es parte del medio acuático natural, y la bacteria es capaz de sobrevivir a los valores extremos de las condiciones ambientales (Fliermans *et al.*, 1981; Atlas, 2009).

2. ANTECEDENTES

La neumonía adquirida por la enfermedad de los legionarios, ahora ya es reconocida en todo el mundo, sin embargo la importancia que se le da en Latinoamérica es muy poca, debido a su incidencia desconocida.

Edelstein y cols. (1982) analizaron ochenta y cinco muestras de agua potable para buscar la presencia de *Legionella pneumophila* mediante siembra directa y por métodos de inoculación en cerdo de guinea, 33 muestras fueron positivas para *Legionella pneumophila* por una o ambas técnicas, 14 muestras fueron positivas para *L. pneumophila* por siembra directa y solo dos muestras fueron positivas para *L. pneumophila* por inoculación en cerdo de guinea, demostrando que la siembra directa es significativamente mejor que la de inoculación.

Colbourne y cols. (1988) realizaron un estudio para detectar *Legionella* en los suministros de agua pública en Inglaterra donde encontraron al organismo en fuentes de agua subterránea, superficiales y en los sistemas de distribución de agua y se dieron cuenta que *Legionella* está asociada con biopelículas o sedimentos.

Marrie y cols. (1992) elaboraron una análisis del agua potable de un hospital en Canadá, donde encontraron que en 545 de las 2200 muestras que estudiaron, se encontró *L. pneumophila*. Durante la hipercloración, 11.7 % de las muestras fueron positivas, mientras que el 41.6 % fueron positivas en ausencia de cloración, también encontraron que dependiendo del lugar donde se recolectaron las muestras, se encontraron serogrupos distintos de *L. pneumophila*, llegando a la conclusión que cada salida de agua sirve como su propio nicho ecológico de los distintos serogrupos de esta bacteria.

Kusnetsov y cols. (1996) estudiaron el crecimiento de *L. pneumophila* a intervalos de 0 a 5 °C en un rango de temperatura de 41.6 a 51.6 °C, encontrando que la multiplicación celular y la producción de carbono disminuyó en todas las cepas a temperaturas superiores de 44 a 45 °C. El CO₂ siguió produciéndose hasta los 51.6 °C, aunque la multiplicación celular se detuvo alrededor de los 48.4 a 50.0 °C, estos datos reflejan la capacidad de la bacteria para tolerar altas temperaturas.

Ohno y cols. (2003) encontraron que los factores de supervivencia de *Legionella pneumophila* en agua caliente de manantial o de agua de grifo se deben a su gran capacidad de ser cultivable y su actividad metabólica, donde sugieren que las poblaciones de *L. pneumophila* celulares potencialmente puede sobrevivir como organismos libres durante largos períodos por mantenimiento de la actividad metabólica, pero temporalmente pierden la capacidad de ser cultivables en ambientes rigurosos y que requieren de reactivación por la ingestión por amebas.

Declerck y cols. (2007) determinaron la capacidad de *L. pneumophila* a colonizar biopelículas flotantes y el impacto de los organismos amebianos como *Acanthamoeba castellanii* en la reproducción de biopelículas asociadas a *Legionella*, encontrando que el aumento de las biopelículas asociadas con la concentración de *L. pneumophila*, fue la replicación intracelular en *A. castellanii*.

Shin y cols. (2008) describen los mecanismos de virulencia que ha desarrollado *L. pneumophila* que le permiten replicarse dentro de un protozoo, explicando muchas de las tácticas de cómo le permiten a esta bacteria realizar varios procesos y mecanismos para su supervivencia y como *Legionella* es capaz de manipular a la célula huésped, así como los procesos de la célula huésped para facilitar o impedir su supervivencia intracelular

Kuroki y cols. (2009) evaluaron la relación entre la incidencia de legionelosis y *Legionella* en el agua de bañeras, donde enviaron cuestionarios a 76 prefecturas y laboratorios públicos municipales de salud en Japón, donde reportaron que en 35 de los 76 se encontraron casos de legionelosis, donde la edad promedio de los afectados fue de 67 años y en la mayoría se encontró que padecían de diabetes o de presión arterial alta.

Tesauro y cols. (2010) identificaron el protocolo de desinfección más eficaz para reducir la presencia de *L. pneumophila* en el sistema de agua de dos hospitales en Italia. Realizando muestreos del 2004 al 2009 con un total de 271 muestreos en agua caliente, de la salida de la caldera y el agua caliente de recirculación de los hospitales, llegando a la conclusión de que a largo plazo la cloración de las fuentes de agua caliente, junto con el mantenimiento cuidadosamente dirigido de tuberías de agua puede conducir a una reducción efectiva de la concentración de *L. pneumophila* en los sistemas de agua de hospital.

Giao y cols. (2011) estudiaron la interacción de *Legionella pneumophila* y *Helicobacter pylori* con algunas especies bacterianas aisladas a partir de biopelículas de agua potable. Donde encontraron que *H. pylori* mostró que *Mycobacterium. chelonae* y *Sphingomonas* spp. pueden ayudar a este patógeno para mantener cultivabilidad durante al menos 24 horas y la presencia de *Acidovorax* sp. y *Sphingomonas* spp. pareció tener un efecto antagónico sobre la cultivabilidad de *L. pneumophila* pero no en la viabilidad (como se evaluó por el contenido de rRNA utilizando la sonda de ácido nucleico peptídico o (PNA), llevando posiblemente a la formación de células viables pero no cultivables (VBNC), mientras que el aumento de *M. chelonae* puede ayudar a la cultivabilidad de este patógeno.

Gea y cols. (2012) escribieron un artículo en donde exponen la epidemiología de la legionelosis y la importancia del control de la transmisión de la bacteria en la lucha contra la enfermedad, donde escriben que la existencia de novedosas instalaciones o sistemas como posibles fuentes de proliferación o dispersión de la bacteria, precisa que sean incluidas en el ámbito de aplicación del desarrollo de una nueva normativa española para la prevención y control de la legionelosis.

Harding y cols. (2013) examinaron el papel de dos importantes factores de virulencia de *L. pneumophila*, la señal de peligro que manda la flagelina y la traslocación de Dot / ICM tipo IVB secreción del sistema SdhA, que es crucial para mantener la integridad de la infección de *Legionella* en su huésped. Ellos demostraron que la flagelina no contribuye a la virulencia, la replicación o la inducción de los mecanismos de limpieza. Por el contrario, la expresión SdhA es importante para la virulencia. Encontraron que en ausencia de SdhA, la virulencia de *Legionella* en hemocitos mostró signos de inestabilidad y a su vez poca o nula adherencia.

3. DESCRIPCIÓN

3.1. Morfología y fisiología de *Legionella* spp. (Microorganismos típicos)

Las bacterias del género *Legionella* son bacilos Gram-negativos aerobios, no esporulados. Miden de 0.5 a 0.7 μm de diámetro y aproximadamente de 2 μm de longitud; su morfología puede ser bacilar o pleomórfica, a veces con formas de filamentos que pueden alcanzar una longitud de 20 μm . A excepción de *Legionella oakridgensis*, que es inmóvil, *Legionella* es generalmente móvil por medio de uno o más flagelos polares o subpolares (Figura 1) las especies restantes son flageladas. La pared celular se compone de una membrana citoplasmática en la superficie interior, una delgada capa de peptidoglicano, y una membrana externa que contiene los lipopolisacáridos estables al calor (LPS) con especies y serogrupos específicos de antígenos O. No hay evidencia definitiva de una cápsula.



Figura 1. *Legionella pneumophila* de 2 μm con flagelo, el cual le proporciona movilidad. Tomada el 10 de marzo del 2013 de <http://microblog.me.uk/90>.

Aunque son bacilos Gram-negativos, *Legionella* en realidad tiñe pobremente en el procedimiento de Gram y por otros métodos de tinción similares, particularmente en tejidos infectados. Esto se adjudica a la presencia de ácidos grasos, que son el componente principal de las paredes celulares. Otros métodos de tinción se han descrito, tales como el método de impregnación de plata de Dieterle (1927) los métodos más eficaces incluyen anticuerpos acoplados a colorantes fluorescentes y de tinción con inmunoperoxidasa. La temperatura óptima para el crecimiento in vitro es de 36 $^{\circ}\text{C}$ (límites 15 a 43 $^{\circ}\text{C}$), con un tiempo de generación de 99 minutos bajo condiciones óptimas (Brenner, *et al.*, 1984; Fealey *et al.*, 1986; Fallon, 1990; States *et al.*, 1993).

El hábitat natural de agua dulce y el suelo del crecimiento requiere la presencia de otras bacterias o de protozoos, que se considera que son los huéspedes naturales de *Legionella* (Rowbotham, 1980; Tison *et al.*, 1980; Wadowsky, *et al.*, 1985; Campos *et al.*, 1993).

Las bacterias del género *Legionella* son parásitos intracelulares de protozoos de agua dulce y utilizan un mecanismo similar para multiplicarse dentro de las células de mamífero. Esta bacteria causa enfermedades respiratorias en humanos cuando un huésped susceptible inhala agua en aerosol o aspira agua que contiene a las bacterias (Field, 1996; Field *et al.*, 2002).

En cuanto a su metabolismo se tratan de bacterias aerobias estrictas, capnofílicas (su crecimiento en el laboratorio se ve favorecido con una atmósfera que contenga un 3 % de CO₂) y relativamente inactivas. La principal fuente de energía la obtienen por el catabolismo de aminoácidos, pero también pueden oxidar glucosa a través de la vía de Embden-Meyerhof-Parnas. La producción de oxidasa es variable. Todas las especies contienen superóxido dismutasa así como catalasa y/o peroxidasa (Yu, 1990; Prats, 2002).

Un pH cercano a la neutralidad es el más adecuado para el crecimiento de este género bacteriano. *Legionella* es termófila, crece en el agua a temperatura entre 20 y 50 °C y posee un desarrollo óptimo a 37 °C (Figura 2). A temperaturas inferiores a 20 °C permanecen latentes, sin multiplicarse y sobreviven un período de tiempo variable entre 40 y 60 °C. Mueren a temperaturas superiores a 60 °C. La temperatura de crecimiento óptimo y superiores son inusuales en la naturaleza, aunque frecuente en instalaciones y dispositivos acuáticos artificiales.

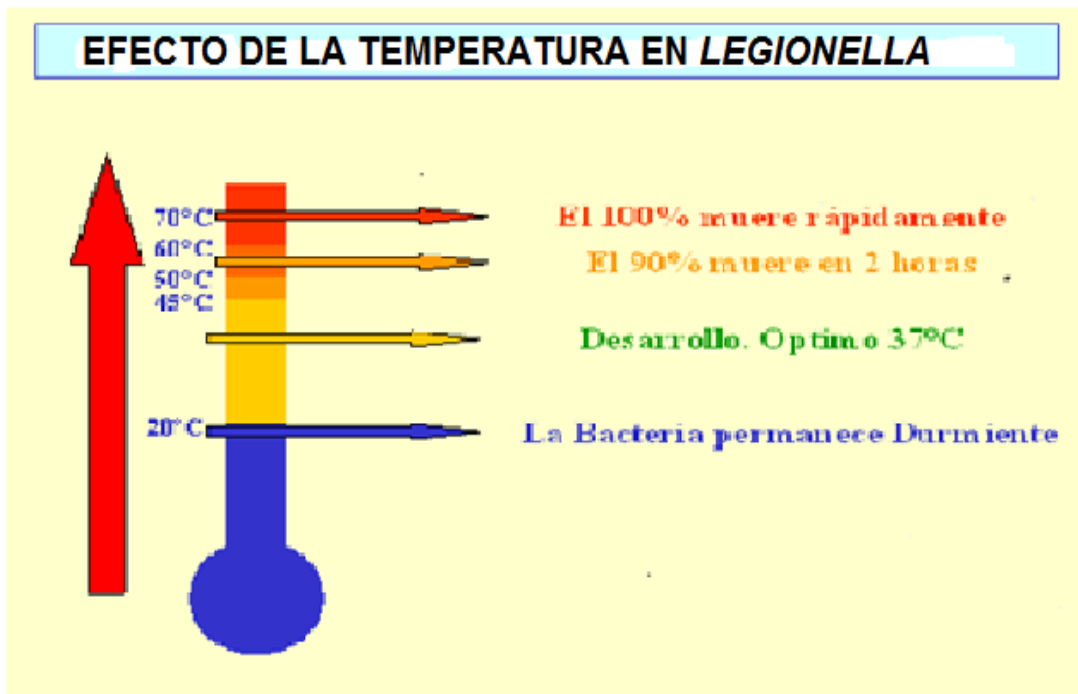


Figura 2. Efecto de la temperatura sobre el desarrollo de las bacterias del género *Legionella*. Tomada el 15 de marzo del 2013 de <http://www.protecciondelasalud.com/2011/08/legionelosis-biologia-instalaciones-de.html>

3.2. Cultivo (características de crecimiento)

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

El aislamiento del microorganismo por cultivo está considerado la técnica de referencia en el diagnóstico microbiológico de la legionelosis. Es la prueba más específica porque permite la detección de todas las especies y serogrupos de *Legionella*. Para su crecimiento se utiliza un medio sólido como el, agar BCYE, tanto en su versión enriquecida como selectiva. Resulta conveniente hacer el cultivo en los dos tipos de medios. Con el empleo del medio selectivo se consigue eliminar la flora comensal que albergue la muestra y con el enriquecido se permite el crecimiento de algunas especies de *Legionella* que pueden ser inhibidas por los antibióticos en el primer caso (Vickers, 1987). *Legionella* puede ser aislada de varios tipos de muestras, entre las que se incluyen agua potable, sangre, tejido pulmonar y muestras respiratorias, aunque estas últimas, como esputos, lavados broncoalveolares o aspirados bronquiales, son las muestras de elección. Esta técnica, a pesar de tener una alta especificidad (100 %), presenta dos problemas fundamentales, baja sensibilidad, del 10 a 80 %, según las series consideradas y largo tiempo de incubación, que retrasa el diagnóstico. (Murdoch, 2003).

Los cultivos se examinan después de 72 a 96 horas de incubación, una de las características de crecimiento de *Legionella* es que son colonias convexas y redondas con bordes intactos, el centro de la colonia es generalmente de color blanco brillante con una apariencia que ha sido descrita como de “cristal tallado”. El centro blanco de la colonia es a menudo bordeado con un círculo azul, púrpura, verde o rojo (Figura 3).

Para algunas muestras de agua con altas concentraciones de bacterias, es necesario utilizar un procedimiento selectivo para reducir el número de estas. El tratamiento con ácido y el calentamiento de muestras se utilizan habitualmente para este propósito. Las legionelas son más resistentes a un pH más bajo y una breve exposición a temperaturas más altas que muchas bacterias de agua dulce (CDC 2005).

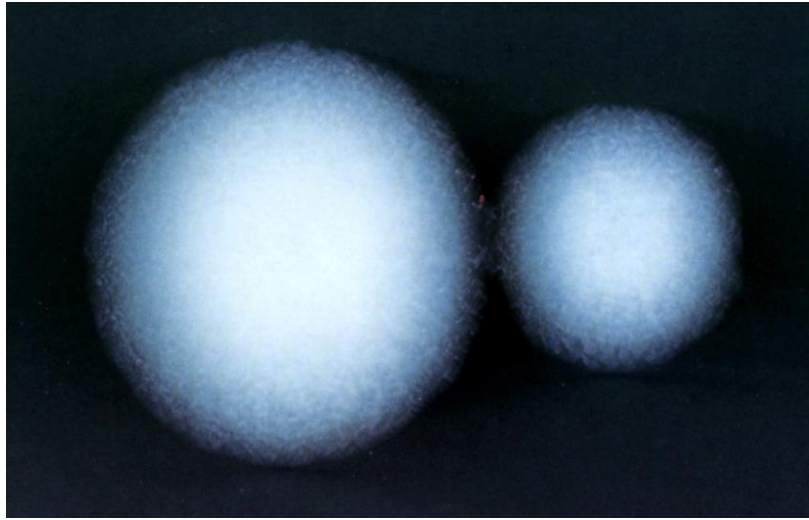


Figura 3. Se puede apreciar la apariencia de “cristal tallado” y el centro de la colonia delimitado con un círculo púrpura. La iridiscencia puede ser de uno o de varios colores; el significado del color es desconocido. (Procedures for the recovery of Legionella from the environment 2005)

4. BIOLOGIA Y ECOLOGIA DE LA BACTERIA

4.1. Hábitat

Legionella es una bacteria que es capaz de sobrevivir en un ámbito amplio de condiciones físico-químicas (Fliermans *et al.*, 1981), multiplicándose entre los 20 y 45 °C (Stout *et al.*, 1985, Sanden *et al.*, 1989) y destruyéndose a 70 °C (Groothuis *et al.*, 1985). Su temperatura óptima de crecimiento es entre los 35 a 37 °C. *Legionella* es considerada una bacteria ambiental ya que su nicho natural son las aguas superficiales como lagos: ríos, estanques, formando parte de su flora bacteriana (Fliermans 1981, Tison *et al.*, 1983, Joly *et al.*, 1984, Hierro *et al.*, 1985, Ortiz-Roque *et al.*, 1987, Veríssimo *et al.* 1991), aunque recientemente Hui (2013) encontró a *Legionella pneumophila* serogrupo 1 en sustancias que contiene grasas tales como: aceite mineral, vaselina o gotas nasales, causando neumonía lipóide, una neumonía poco frecuente. Desde estos reservorios naturales la bacteria coloniza los sistemas de abastecimiento de las ciudades (Voss *et al.*, 1985; Colbourne, 1988), y a través de la red de distribución de agua, se incorpora a los sistemas de agua sanitaria (fría o caliente) u otros que requieran agua para su funcionamiento y puedan generar aerosoles. Estas instalaciones, en ocasiones, favorecen el estancamiento del agua y la acumulación de productos que sirven de nutrientes para la bacteria, como lodos, materia orgánica, material de corrosión y amebas, formando una biopelícula (Barbaree *et al.*, 1986).

La presencia de esta biopelícula juega un papel importante, junto con la temperatura del agua, en la multiplicación de *Legionella* hasta concentraciones infectantes para el hombre. A partir de estos lugares, las concentraciones de la bacteria pueden alcanzar otros puntos del sistema en los que, si existe un mecanismo productor de aerosoles, la bacteria puede dispersarse en forma de aerosol. Las gotas de agua conteniendo la bacteria pueden permanecer suspendidas en el aire y penetrar en las vías respiratorias alcanzando los pulmones (Fitzgeorge *et al.*, 1983).

Las instalaciones que más frecuentemente se encuentran contaminadas con *Legionella* y han sido identificadas como fuentes de infección son los sistemas de agua sanitaria, caliente y fría (Tobin *et al.*, 1980; Wadowsky *et al.*, 1982; Bartlet *et al.*, 1983; Stout *et al.*, 1992; Joseph *et al.*, 1996), torres de refrigeración (Dondero *et al.*, 1980; Mahony *et al.*, 1990; Watson *et al.*, 1994; Fiore *et al.*, 1997) y condensadores evaporativos (Cordes *et al.*, 1980;

Breiman *et al.*, 1990), tanto en hospitales como en hoteles u otro tipo de edificios. En la literatura científica también se encuentran descritas en el ámbito hospitalario, infecciones relacionadas con equipos utilizados en terapia respiratoria (Arnou *et al.*, 1982; Kaan *et al.*, 1985; Moiraghi *et al.*, 1987; Mastro *et al.*, 1991). Otras instalaciones relacionadas con infección como fuentes ornamentales (Schlech 1990; Hlady *et al.*, 1993), humidificadores (Mahoney *et al.*, 1992), centros de rehabilitación y recreo (Bornstein *et al.*, 1989), y piscinas en cruceros (Jernigan *et al.*, 1996).

Una característica biológica importante de esta bacteria es su capacidad de crecer intracelularmente, tanto en protozoos (Barbaree *et al.*, 1986) como en macrófagos humanos (Horwitz *et al.*, 1980). En ambientes acuáticos naturales y en instalaciones de edificios la presencia de protozoos juega un papel importante soportando la multiplicación intracelular de la bacteria, sirviendo este proceso de mecanismo de supervivencia en condiciones ambientales desfavorables (Rowbotham 1980; Fields *et al.*, 1989; Steinert *et al.*, 1997).

4.2 Ciclo de vida *Legionella pneumophila*.

Los ciclos de vida dicen mucho acerca de la historia natural de un organismo vivo. Se trata de una síntesis de años de evolución, de adaptación, de especialización y de su supervivencia en la naturaleza. Desde el punto de vista de las enfermedades infecciosas, los ciclos de vida pueden proporcionar pistas para entender los mecanismos de patogénesis de un parásito particular. El origen de los patógenos y la evolución de la virulencia se encuentran dentro del dominio de la ecología microbiana, y el ciclo de vida de *L. pneumophila* seguramente no es la excepción.

Las amebas son los huéspedes primarios naturales de *L. pneumophila* y constituyen el eje central alrededor del cual el ciclo de vida de *L. pneumophila* gira (Figura 4). Actualmente, se reconocen alrededor de 52 especies de *Legionella*. (Benson *et al.*, 1998), todas las cuales son capaces de parasitar amebas. Además, un gran número de legionelas que no se pueden cultivar *in vitro* demuestran que ha desarrollado relaciones intracelulares con amebas específicas. Muy probablemente, los miembros del género *Legionella* (incluida *L. pneumophila*) aprendieron a convertirse en parásitos intracelulares a través de encuentros frecuentes con amebas (Molmeret *et al.*, 2005), y desde entonces han evolucionado hasta

establecer un amplio espectro de relaciones con estos huéspedes, desde la intracelular facultativa y patógena, a endosimbiótica.

El ciclo de vida de *L. pneumophila*, descrito por primera vez por Rowbotham (1986), se inicia con la invasión de un ejército de amebas, y procede a través de una serie de eventos intracelulares que conducen a la replicación activa de *L. pneumophila* y luego a la liberación de la progenie bacteriana que infecta a nuevos huéspedes. Como era de esperar, el ciclo comienza y termina en el mismo punto (es decir, infección de un nuevo huésped). La siguiente es una breve descripción de los eventos específicos que constituyen el ciclo de vida de *L. pneumophila* y su progresión a través de sus huéspedes.

Legionella pneumophila tiene dos fases distintas en su ciclo de vida: una fase replicativa seguida de una fase infecciosa o transmisiva. La fase replicativa cuenta con una bacteria no móvil con una toxicidad baja o inexistente. La fase infecciosa se produce después de una transformación que conduce a una más corta, y más gruesa varilla. Esta nueva forma es móvil debido al crecimiento de los flagelos y es mucho más tóxica para su huésped. El cambio a la fase infecciosa se produce una vez que la bacteria ha agotado las fuentes locales de nutrientes en el huésped, lo que desencadena varias respuestas vía específica (Swanson, 2007).

4.2.1 Modo de infección

Los hospederos principales de *L. pneumophila* son los macrófagos, amebas y humanos. La bacteria inicia la infección al ser fagocitado por los macrófagos al igual que cualquier microbio extraño. Sin embargo una vez en el interior del macrófago, *L. pneumophila* empieza a replicarse (Fraser, 1986). La bacteria también se rodea de una gruesa membrana vacuolar, que además previene la lisis. Una vez que los nutrientes de los macrófago hospederos se agotan, las bacterias recién replicadas entrar en su fase de transmisión, lisan los macrófagos infectados y reinician el proceso de infección.

Existen dos cambios morfológicos importantes en el ciclo de vida de *L. pneumophila*. El primer cambio es la formación de vacuolas unidas a la membrana que protege a la bacteria una vez que ha sido fagocitada por los macrófagos. Este cambio estructural proporciona una barrera física que impide que las bacterias en su fase replicativa se presenten en un

lisosoma (Swanson, 2007). El segundo cambio es la transformación de la bacteria de su fase replicativa a su fase infecciosa, con varios cambios morfológicos distintos. Todos estos cambios aumentan la virulencia de las bacterias e incluyen el crecimiento de los flagelos que confieren la motilidad de *L. pneumophila*, lo que le permite hacer más fácilmente contacto con las células huésped (Rathore *et al.* 2006).

4.2.2 La invasión celular de *Legionella*

La unión de *L. pneumophila* a su hospedero y la posterior invasión parecen involucrar a varios actores moleculares. La lectina de 170-kD galactosa/N-acetylgalactosamina-inhibidora de amebas (Gal / GalNAc lectina) parece servir como un receptor para *L. pneumophila*, y es necesario para la invasión de una ameba de vida libre como *Hartmannella vermiformis* (Venkataraman *et al.* 1997). Este receptor es desfosforilado en la interacción de *L. pneumophila* con *H. vermiformis*, un proceso que requiere el contacto con bacterias viables, lo que sugiere que *L. pneumophila* desempeña un papel activo en el proceso de invasión. Debido a que la invasión depende a menudo de acoplamiento efectivo, es posible que la lectina Gal / GalNAc sirva como un sitio de unión primario requerido para llevar a *Legionella* cerca de un receptor secundario que media la invasión. Sin embargo, el ligando bacteriano para la lectina Gal / GalNAc no ha sido todavía identificado. Todavía no está claro qué mecanismo molecular llevan a cabo las amebas para internalizar a *L. pneumophila* (o qué mecanismo activara *L. pneumophila* para su internalización por amebas) ya que la inhibición de la polimerización de actina citocalasina D, o la interrupción de microtúbulos por la colchicina no inhiben la captación de *L. pneumophila* (Harb *et al.*, 1998; King *et al.*, 1991). Sin embargo, las proteínas del citoesqueleto como paxillin y vinculin homólogos se desfosforilaron selectivamente a la interacción de *H. vermiformis* con *L. pneumophila* (Venkataraman *et al.*, 1998), lo que sugiere que estas proteínas pueden estar implicados en la internalización de *L. pneumophila*.

Sin embargo, otras formas de internalización (tal vez se asemeja endocitosis mediada por receptor o macropinocitosis) ocurren y parecen ser incluso más común que la fagocitosis (Abu-Kwaik 1996; Campos 1993; Venkataraman *et al.*, 1998). Como lo implica Harb y cols. (1998) no se debe asumir que todas las amebas utilizan los mismos mecanismos para internalizar a *L. pneumophila*.

4.2.3 Internalización y crecimiento celular.

Los sucesos morfológicos que siguen a la internalización de *L. pneumophila* por amebas son similares a los caracterizado a fondo en células de mamífero. Estos incluyen la asociación de la vacuola que contiene *Legionella* con vesículas y el retículo endoplásmico, la deformación de la membrana, etc. Además, los métodos bioquímicos han demostrado que las vacuolas de las amebas que contienen *L. pneumophila* no se fusionan con los lisosomas, y posteriormente adquieren el retículo endoplasmático (RE) y marcadores (Abu-Kwaik 1996). Es dentro de esta vacuola especializada rodeada por el RE que *L. pneumophila* se replica. Los mismos eventos intracelulares morfológicos y bioquímicos descritos en *Hartmannella* y en *Acanthamoeba* también suceden en la ameba *Dictyostelium discoideum* (Hägele 2000, Solomon *et al.*, 2000). Esta ameba ha surgido como un modelo excelente para estudiar la interacción de *Legionella*-hospedero, principalmente debido a que es un organismo haploide con una secuencia de genoma conocido, y para el cual varias herramientas genéticas se han desarrollado (Cianciotto *et al.*, 1992; Cirillo *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 1997; Liles *et al.*, 1999; Miyake *et al.*, 2005; Polesky *et al.*, 2001; Pruckler *et al.*, 1995; Segal *et al.*, 1999).

Sin embargo, *L. pneumophila* parece utilizar exclusivamente los subconjuntos de genes para establecer infecciones intracelulares en células de mamífero (Gao *et al.*, 1998) o amebas (Brieland *et al.*, 1997).

4.2.4 Fin de la replicación y salida.

Una vez que la célula huésped se ha perdido después de la replicación de *L. pneumophila*, la bacteria progenie se libera al ambiente donde las nuevas células huésped se encuentran, y entonces el ciclo de vida se completa. La muerte de la célula huésped y la liberación de las bacterias progenie parecen ser dos procesos relacionados que son impulsados por la capacidad de *L. pneumophila* a formar poros en las membranas.

L. pneumophila puede ser liberada dentro de las vesículas, probablemente como consecuencia de las amebas tratando de deshacerse de sus vacuolas alimenticias antes del enquistamiento. En este proceso, las vesículas que contienen cientos de legionelas son producidas, en contraste con la liberación de *Legionella* por el proceso lítico. Debido a que

estas vesículas son de tamaño respirable, se ha argumentado que podrían actuar como complejas unidades infecciosas en la transmisión de la enfermedad del legionario. Por otra parte, dentro de las vesículas *Legionella* parece ser más resistente a algunos de los retos ambientales (Berk *et al.*, 1998), lo que sugiere que este modo de salida está asociada con ventajas adicionales.

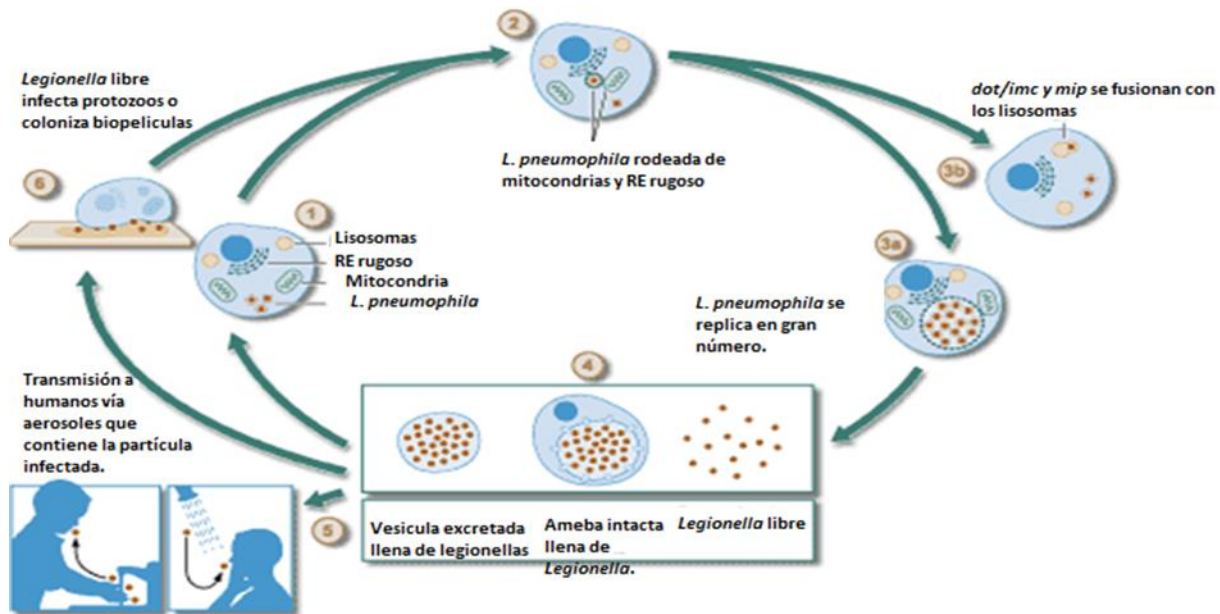


Figura 4. El ciclo de vida ambiental de *L. pneumophila* dentro de los protozoos. 1. *L. pneumophila* a partir de biopelículas con otras bacterias o protozoos en suspensión de protozoos infectados. 2. A raíz de la entrada, *L. pneumophila* reside en una vacuola unida a una membrana que recluta a orgánulos de la célula huésped, tales como la mitocondria y el retículo endoplásmico rugoso y *dot / icm* y *pmi* se fusiona con los lisosomas (3b). *L. pneumophila* se replica dentro de esta vacuola especializada y alcanza un gran número (3a). 4. Legionella libre, lisa su célula huésped, la ameba se encuentra intacta pero llena de *Legionella* y posteriormente excreta vesículas llenas de la bacteria. 5. La transmisión al hombre se produce a través de medios mecánicos, tales como grifos y duchas. La infección en seres humanos se produce por inhalación de la partícula infecciosa y establecimiento de la infección en los pulmones. 6. Las *Legionellas* que han escapado a su célula huésped puede sobrevivir en suspensión durante largos periodos de tiempo, reinfectar otros protozoos, o recolonización de biopelículas. Tomada el 15 de marzo del 2013 de <http://newsarchive.asm.org/oct00/figs/fig1f2.htm>.

4.3. Biopelículas y *Legionella* en el ambiente

Las biopelículas (Figura 5) son comunidades integradas por organismos procariontas y eucariotas, como: bacterias, algas, hongos y protozoos, en el seno de una estructura o matriz polimérica, que se asocian estableciendo interacciones que contribuyen al mantenimiento de las mismas (Atlas *et a.*, 2002). Por lo tanto la biopelícula es una forma de resistencia de los microorganismos que lo forman a condiciones adversas tales como la

limitación de nutrientes, el pH o el oxígeno. El movimiento del agua en los circuitos puede provocar que algún microorganismo se desprenda de la biopelícula dando lugar a la colonización de otras zonas del circuito si las condiciones lo permiten. La arquitectura de las biopelículas es heterogénea, de modo más común las microcolonias adquieren una morfología conforme o en forma de hongo, entre las que se encuentran canales por los que circula el agua, funcionando de un modo similar a lo que sería un sistema circulatorio primitivo, permitiendo la llegada de nutrientes, la eliminación de desechos y la comunicación interbacteriana.

En estas comunidades se ha encontrado la asociación *Legionella*-protozoo y también a *Legionella* en forma libre. De hecho, la amplia disponibilidad de nutrientes en las biopelículas ha llevado a algunos investigadores a plantear que esta forma de legionela sésil podría sobrevivir y multiplicarse extracelularmente en ausencia de protozoos hospedadores (Rogers *et al.*, 1992), de modo similar a otras bacterias de multiplicación facultativa intracelular. De ser cierta esta posibilidad de multiplicación extracelular en el seno de biopelículas, podría tener importantes repercusiones en las estrategias de control (Fields *et al.*, 2002). Pero hoy, sin embargo, se acepta de modo generalizado que esta bacteria, en ausencia de protozoos, puede persistir en biopelículas durante largos periodos, pero no multiplicarse. Algunas biopelículas estudiadas, como son las asociadas a implantes médicos como catéteres, válvulas artificiales, lentes de contacto, etc., generan gran preocupación, ya que pueden ser hasta 500 veces más resistentes a los antibióticos que las células planctónicas o de flotación libre. De hecho en ecosistemas acuáticos, muchos de los tratamientos químicos sobre las biopelículas tienen un efecto limitado, viéndose afectados los microorganismos que residen en las biocapas superficiales.

FORMACIÓN DE BIOPELICULAS :

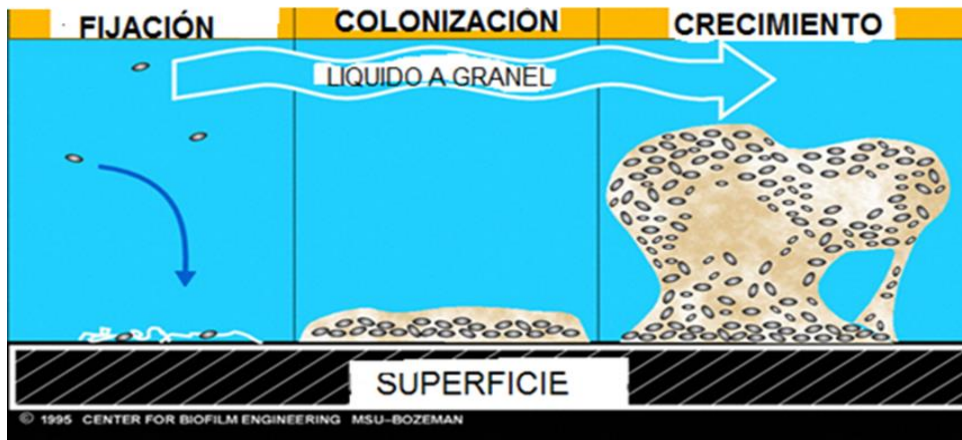


Figura 5. Formación de biopelícula. Primero el protozoo, alga, hongo o bacteria se adhiere a la superficie, una vez en la superficie, estos organismos secretan una sustancia viscosa o similar al pegamento (polisacáridos) que les permite fijarse firmemente en la superficie y forman conexiones con otros organismos. Después de la unión, estos organismos se dividen y se expanden en las comunidades multicelulares o microcolonias y crear una barrera protectora comúnmente conocida como una *biopelícula*. Tomada el 22 de marzo del 2013 de <http://www.uweb.engr.washington.edu/research/tutorials/biofilm.html>.

4.4.- Factores físico-químicos que favorecen la supervivencia de *Legionella* spp. en el ambiente.

Para que *Legionella* spp. pueda llegar a tener capacidad infectiva, es necesario que alcancen en el agua una cierta concentración de los mismos. Los principales factores favorecedores para su supervivencia y multiplicación, son los siguientes:

Legionella es una bacteria termotolerante, capaz de multiplicarse entre los 20 y 45 °C, con un crecimiento óptimo alrededor de 37 °C (Katz *et al.*, 1987), puede sobrevivir entre los 40 y 60 °C, inactivándose por encima de los 70 °C (Groothuis *et al.*, 1985).

El agua, por si sola, no permite la proliferación de *Legionella*, *Legionella pneumophila* puede sobrevivir durante largo tiempo, pero no multiplicarse, en agua destilada y agua sanitaria esteril (Skaliy *et al.*, 1979). La suciedad del agua garantiza la presencia de otros microorganismos y nutrientes apropiados para su crecimiento. Hay una relación entre *Legionella* y otros microorganismos (algas, cianobacterias, protozoos) en forma de constituyentes orgánicos disueltos por un exceso de producción nutrientes orgánicos o bien por descomposición de los microorganismos (aminoácidos como cisteínas) (Roger *et al.*, 1994).

En 1963, Drozanski (1963) describió el aislamiento de unos parásitos de amebas procedentes de muestras de suelo que eran incapaces de crecer en medios de cultivo de laboratorio. Es posible que estos parásitos bacterianos fueran *Legionella* spp. Sin embargo, no fue hasta 1980 que se describió la relación entre amebas y *L. pneumophila* (Rowbotham 1980).

Los protozoos ayudan a *Legionella* a protegerse de los efectos de los biocidas y de la desinfección térmica. *Legionella* spp. puede sobrevivir en amebas enquistadas durante largos periodos de tiempo (Barker *et al.*, 1992). Las amebas enquistadas se mantienen viables después de tratamientos con 100 mg/L de cloro durante 10 minutos así como después del tratamiento a 80 °C (Storey *et al.*, 2004), y se ha postulado que este puede ser el mecanismo por el que *L. pneumophila* es capaz de sobrevivir a condiciones ambientales adversas y sobrevivir en los aerosoles transmitidos por el aire, junto con su capacidad de entrar en estado de viable pero no cultivable.

La formación de procesos de corrosión es un factor muy importante que favorece el desarrollo de *Legionella*. Aparte de ser un elemento importante en el desarrollo de biocapas, el hierro actúa como un nutriente de *Legionella* favoreciendo su multiplicación, aunque también el almidón o carbón de leña más cisteína y agregados de hierro (Pine *et al.*, 1979). Los cetoácidos, agregados de hierro y cisteína juntos estimulan el crecimiento de *Legionella* en ausencia de luz (Pine *et al.*, 1986).

Cuadro 2. Condiciones favorables para la proliferación de *Legionella*

Temperatura	Con un rango entre 25 y 45 °C. Mayor entre 35 y 37 °C.
Estancamiento de agua	Existencia de zonas muertas, baja la velocidad de circulación
Calidad del agua	Presencia de nutrientes, depósitos de sólidos en suspensión, conectividad, turbidez, etc.
Tipo de superficie en contacto con agua	Tipo de material (celulosa, madera, etc.), rugosidad, depósitos cálcicos, corrosión.
Depósito biológicos (biocapa)	Protozoos, algas, bacterias.

Las instalaciones, que colonizadas poseen elementos que amplifican y favorecen su crecimiento por la acumulación de nutrientes y sedimentos, y que más frecuentemente se contaminan con *Legionella* y han sido identificadas como fuentes de infección, son los sistemas de distribución de agua sanitaria y los equipos de enfriamiento por dispersión de agua en un flujo de aire (torres de refrigeración) tal y como se especifica en el cuadro 3.

Cuadro 3. Instalaciones con mayor, menor y riesgo de proliferación de Legionella.

<p>1. Instalaciones con mayor probabilidad de proliferación y dispersión de <i>Legionella</i>:</p> <ul style="list-style-type: none">a) Torres de refrigeración y condensadores evaporativos.b) Sistemas de agua caliente sanitaria con acumulador y circuito de retorno.c) Sistemas de agua climatizada con agitación constante y recirculación a través de chorros de alta velocidad o la inyección de aire (spas, jacuzzis, piscinas, vasos o bañeras terapéuticas, bañeras de hidromasaje, tratamientos con chorros a presión, otras).d) Centrales humidificadoras industriales. <hr/>
<p>2. Instalaciones con menor probabilidad de proliferación y dispersión de legionela:</p> <ul style="list-style-type: none">a) Sistemas de instalación interior de agua fría de consumo humano (tuberías, depósitos, aljibes), cisternas o depósitos móviles y agua caliente sanitaria sin circuito de retorno.b) Equipos de enfriamiento evaporativo que pulvericen agua, no incluidos en el apartado 1.c) Humectadores.d) Fuentes ornamentales.e) Sistemas de riego por aspersión en el medio urbano.f) Sistemas de agua contra incendios.g) Elementos de refrigeración por aerosolización, al aire libre.h) Otros aparatos que acumulen agua y puedan producir aerosoles. <hr/>
<p>3. Instalaciones de riesgo en terapia respiratoria:</p> <ul style="list-style-type: none">a) Equipos de terapia respiratoria.b) Respiradores.c) Nebulizadores.d) Otros equipos médicos en contacto con las vías respiratorias.

4.5. Invasión a protozoos por *Legionella* spp.

Legionella pneumophila es una bacteria intracelular que reside dentro de amebas y macrófagos en un compartimento especializado denominado (LCV) o vacuolas que contiene legionelas. Además de proporcionar un nicho intracelular para la replicación, la LCV ayuda a prevenir la liberación de componentes bacterianos en el citoplasma (Harding *et al.*, 2013). En la última década se ha avanzado notablemente en desentrañar la resistencia de algunos microorganismos a su predación natural por protozoos, acuñándose el término ARB por sus siglas en inglés (Bacterias Resistentes a Amebas) o, más recientemente, el de microorganismos resistentes a amebas. Esta resistencia varía hasta asociaciones simbióticas como el parasitismo (Winięcka-Krusnell *et al.* 2001). Patógenos tan relevantes como *Coxiella burnetii*, *Escherichia coli* O157, *Francisella tularensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Legionella* spp., etc. (Greub *et al.*, 2004) disponen de mecanismos de resistencia cuya comprensión plantea importantes implicaciones clínicas y epidemiológicas (Winięcka-Krusnell *et al.*, 2001) en ámbitos como la seguridad alimentaria, la seguridad quirúrgica, la sanidad ambiental, entre otras.

De todos los microorganismos resistentes a amebas, la relación que *Legionella* establece con ciertos protozoos de vida libre, es sin duda la mejor conocida. Se han descrito 14 diferentes especies de amebas y dos de protozoos ciliados en los que *Legionella* es capaz de multiplicarse (Borrella *et al.*, 2005), entre los que destacan los géneros *Acanthamoeba* (Figura 6), *Naegleria*, *Tetrahymena* y *Hartmannella*, cuya presencia en el agua y suelo es muy frecuente, especialmente los dos primeros en ambientes hídricos termales. Rowbotham, al inicio de los años ochenta, hizo una detallada descripción muy novedosa para su tiempo. Observó que *Legionella*, tras su ser fagocitada por amebas, contrariamente a lo esperado, iniciaba su replicación en el interior del fagosoma o vacuola digestiva, aumentando consecuentemente de tamaño hasta ocupar todo el espacio citoplasmático. La lisis final de la ameba, con la liberación masiva de bacterias al medio, iniciaría nuevamente el ciclo en otras amebas.

También, advirtió que en ocasiones se formaba en vez de una sola vacuola grande, diversas vesículas de menor tamaño y que tras la lisis del protozoo se liberaban, no solo bacterias, sino también vesículas sin romper llenas de bacterias. No pudo, a pesar de todo, discernir

en qué casos se producían vesículas y en cuales se formaba una sola vacuola. Pero planteó la hipótesis que estas vesículas, de tamaño respirable menor de 5 μm , que contenían formas viables de *Legionella*, podían constituir las partículas infectivas de la Enfermedad del Legionario, lo que explicaba entre otros interrogantes, porque la enfermedad no se transmitía entre personas. Estudios posteriores, en 1998, detallaron como más del 90 % de las vesículas cargadas de bacterias expelidas por *Acanthamoeba*, tenían un tamaño entre 1 a 5 μm , y eran por tanto capaces de inhalarse y alcanzar el alveolo pulmonar. Estas vesículas cargadas de *Legionella* son muy resistentes a la acción de los biocidas y a tratamientos físicos (Berk *et al.*, 1998). Las amebas de vida libre presentan básicamente dos estados: el trofozoíto, o forma de vida metabólicamente activa, y el quiste, o forma de resistencia, generado cuando las condiciones medioambientales son adversas. Rowbotham (1986), también describió la habilidad de *Legionella* de permanecer en el interior de los quistes formados a partir de trofozoíto infectados, manteniéndose viables durante largos periodos de tiempo. Estudios posteriores, confirmaron como amebas infectadas con *Legionella*, antes de su enquistamiento, liberaban al medio gran parte de las vesículas presentes en el trofozoíto, cargadas de bacterias.

Berk, (1998) y su grupo de investigación en la Universidad de Tennessee, han comprobado que es de suma importancia la relación numérica que haya entre bacterias y protozoos, el ratio que se conoce con el nombre de infección de multiplicidad o por sus siglas en ingles MOI (multiplicity of infection). Así, cuando el número de bacterias libres aumenta en relación al número de amebas, hasta alcanzar ratios de 1.000 a 1 (MOI mayor de 103), el número de vesículas producidas por cada ameba también aumenta. Valores bajos del ratio (MOI menor a 102) parece que llevan a la formación de un escaso número de vesículas o una sola vacuola de gran tamaño con gran número de formas móviles de *Legionella*. Parece como si la estrategia utilizada por la bacteria fuera la de aumentar su número cuando la población de protozoos a infectar es grande, para pasar a formar vesículas conforme el número de protozoos infectados disminuye.

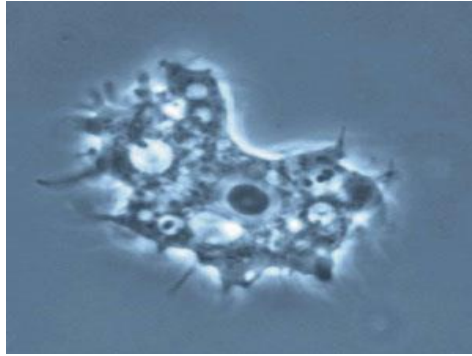


Figura 6. Trofozoíto de *Acanthamoeba* Los trofozoítos son pleomórficos, tienen una vacuola contráctil, polaridad antero-posterior, seudópodos con apariencia de espinas (acantópodos), núcleo también con nucléolo grande, central y su tamaño oscila entre 15 - 50 μm , de acuerdo a la especie. Tomada el 02 de abril del 2013 de <http://www.faba.org.ar/fabainforma/402/peec01.htm>.

La simbiosis intracelular es un fenómeno biológico amplio e importante. Uno de los modelos *in vitro* más estudiados, es el que se lleva a cabo entre *Legionella* y amebas de vida libre (Herrera *et al.*, 1998).

Algunas asociaciones comenzaron como infecciones patógenas letales; tal es el caso de *Amoeba proteus*, especie cultivada por Jeon, durante 1966 en la Universidad de Tennessee, la cual fue infectada por bacterias. Al principio, el gran número de bacterias internas mató a casi todas las amebas, esto, debido a que estas bacterias debilitaron las enzimas digestivas de las amebas mediante la expulsión de las enzimas a través de la membrana de las vacuolas digestivas. Debido a estas bacterias no eran digeridas, atravesaban la membrana de las vacuolas y entraban al citoplasma, ahí comenzaban a crecer y a dividirse. Si las bacterias se dividían antes de que las amebas lo hicieran, entonces las amebas se lisaban.

Este comportamiento bacteriano es extremadamente similar al de las bacterias que producen la “enfermedad del Legionario”, por lo cual se le llamó *Legionella* a esta especie de bacterias. Sin embargo, este crecimiento bacteriano puede ser restringido por la célula infectada. Jeon (1995), logró observar que algunas de las amebas poseían un número significativamente menor de bacterias, por lo cual su infección era benigna. Después de 5 años, la mayoría de las amebas poseían este bajo número de bacterias, lo cual mostró que los descendientes de las amebas que sobrevivieron a la infección, ahora requerían de estas mismas bacterias para su supervivencia y crecimiento. Lo que antes fue una infección patógena se había convertido en una simbiosis mutualista (Margulis *et al.*, 1992).

Podemos definir los diferentes tipos de relaciones simbióticas de la siguiente manera: habrá “competencia” entre los miembros de una comunidad por las fuentes de nutrientes y energía cuando estos sean escasos, y si no lo son, entonces los organismos se multiplicarán y competirán por el espacio; “comensalismo” cuando un organismo se beneficie mientras que el otro aparentemente no sufra alteración alguna; “amensalismo” cuando un organismo sea afectado mientras que el otro no lo sea; “parasitismo” y “depredación” cuando un organismo se beneficie y el otro sea afectado o incluso muerto; “mutualismo” cuando ambos organismos se beneficien entre sí; y “sintrofia” cuando los dos organismos se encuentren a menudo juntos y sean más productivos en combinación que separados (Campbell, 1987; Herrera, 1998).

Se cree que la mayoría de los protozoarios sirven como células hospederas para la replicación intracelular de ciertas especies de *Legionella* (Newsome *et al.*, 1998). En los últimos años se ha incrementado el número de estudios *in vitro*, que documentan la ecología y patogenicidad por multiplicación intracelular de algunas especies de *Legionella* en amebas de vida libre (Kwaik *et al.*, 1998), tales como *Acanthamoeba* spp. *Naegleria* spp. y *Hartmannella* spp. (Newsome *et al.*, 1998; Berk *et al.*, 1998; Neumeister *et al.*, 1997); además de otros protozoarios, tales como *Tetrahymena* spp. (Barbaree *et al.*, 1986). Una de estas especies es *L. pneumophila*, la cual llega a reproducirse en el interior de las amebas, pero se vuelve no cultivable cuando se aísla de la célula hospedera y se cultiva en el laboratorio (Adeleke *et al.*, 1996); esto debido a que las amebas le proporcionan un ambiente más favorable que el de los medios de cultivo convencionales. Sin embargo, esta puede ser reactivada al ser introducida en una nueva ameba, como es la *Acanthamoeba castellanii* (Steinert *et al.*, 1997).

Cabe destacar que a *L. pneumophila* se le ha considerado como patógena, no solo para las células humanas sino también para las amebas, debido a que estas se lisan como resultado de la replicación intracelular de la bacteria (Newsome *et al.*, 1998), una vez que ésta logra atravesar la membrana de las vacuolas digestivas y ha penetrado en el citoplasma de la ameba. También se ha estudiado la transmisibilidad de algunos endosimbiontes bacterianos entre clones de especies de *Acanthamoeba* (Gautom *et al.*, 1995). En algunas especies de *Legionella*, se ha llevado a cabo la multiplicación extracelular en agar amortiguado de

carbón y extracto de levadura (agar BCYE); pero sin éxito en una variedad de medios de cultivo convencionales (Newsome *et al.*, 1998). La mayoría de las especies de *Legionella* estudiadas han sido aisladas del suelo, agua, sistemas de aire acondicionado y enfriamiento, regaderas y pacientes con neumonía (Adeleke *et al.*, 1996).

5. PATOGENICIDAD DE *Legionella*

5.1. Patogenia

La característica principal de la patogénesis de *Legionella* es su capacidad para multiplicarse intracelularmente. Durante la infección de las células por *Legionella pneumophila*, la bacteria segrega un gran número de proteínas efectoras en el citoplasma de la célula huésped, lo que le permite alterar muchos procesos celulares y hacer que la vacuola y la célula huésped se tornen más hospitalarias para la replicación bacteriana (Sun *et al.*, 2013) En su hábitat natural se multiplica, fundamentalmente, en el interior de protozoos de vida libre. Podría suponerse que una bacteria capaz de sobrevivir a la fagocitosis y lisis dentro de un protozoo, e incluso capaz de multiplicarse, está paralelamente seleccionada para sobrevivir a la fagocitosis por un macrófago alveolar cuando accidentalmente llega al pulmón humano.

Los factores de virulencia que facultan a *Legionella* no se han definido claramente, pero se sabe que un cambio importante inducido por la infección, es el reclutamiento de vesículas derivadas del retículo endoplásmico a la superficie de la vacuola, donde se fusionan con la membrana vacuolar y evita que se acidifique (Sun *et al.*, 2013). No obstante, el análisis del proceso de infección en protozoos y células huésped humanas han ayudado a identificar algunos factores.

Las estructuras de superficie de membrana juegan un papel importante en la patogenia de *Legionella* (Cianciotto, 2001; Heuner, 2002). La adherencia seguida de la entrada de la bacteria en la célula huésped es un paso crucial en el ciclo de infección. Ciertas proteínas de superficie de membrana junto con el lipopolisacáridos (LPS), el flagelo y el pili tipo IV, están involucrados en la adherencia y entrada de *Legionella* en macrófagos alveolares y protozoos. Estas proteínas incluyen, entre otras: la principal proteína de la membrana externa o por sus siglas en inglés the major outer membrane protein (MOMP), la proteína de choque térmico o por sus siglas en inglés the heat shock protein (Hsp60) y potenciador de la infectividad del macrófago o por sus siglas en inglés, macrophages infectivity potentiator (mip).

La MOMP es una porina que se une al componente C3 de complemento, y media la entrada de *L. pneumophila* vía receptores de macrófagos de complemento CR1 y CR3 (Belliger *et al.*, 1990). Sin embargo, la fagocitosis de *L. pneumophila* también puede producirse por un mecanismo independiente de complemento (Weissgerber *et al.*, 2003).

La proteína Hsp60 aumenta la invasión de células epiteliales (Garduño *et al.*, 1998)

La proteína Mip, codificada por el gen *mip* (Field, 1996), es un producto claramente asociado a la virulencia de *Legionella*; es necesaria para una infección eficiente tanto en células fagocíticas humanas como protozoos (Cianciotto *et al.*, 1992) ya que interviene en todo el género (Cianciotto *et al.*, 1989) e incluso se utiliza la secuencia de gen *mip* para identificar especies de *Legionella* (Ratcliff *et al.*, 1998).

5.2. Descripción de las enfermedades que provoca *Legionella* spp.

La legionelosis es una enfermedad bacteriana de origen ambiental que presenta fundamentalmente dos formas clínicas perfectamente diferenciadas: la infección pulmonar o “Enfermedad del Legionario” (McDade *et al.*, 1977) que se caracteriza por neumonía con fiebre alta, y la forma no neumónica conocida como “Fiebre de Pontiac” (Fraser *et al.*, 1979) que se manifiesta como un síndrome febril agudo y autolimitado.

La neumonía es clínicamente indistinguible de otras neumonías atípicas y con frecuencia los pacientes requieren hospitalización. El periodo de incubación es normalmente de 2 a 10 días, es más frecuente en personas de edad comprendida entre 40 y 70 años, presentándose de dos a tres veces más entre varones que entre mujeres, siendo rara en niños. El riesgo de contraer la enfermedad depende del tipo e intensidad de la exposición y del estado de salud del sujeto susceptible, aumentando en inmunocomprometidos, en diabéticos, en pacientes con enfermedad pulmonar crónica, así como en fumadores o alcohólicos (Martson *et al.*, 1994). La tasa de ataque (nº de enfermos/nº de personas expuestas) en brotes es de 0,1 a 5 % en población general (OMS 1990); la letalidad, en la comunidad, supone menos del 5 %, pero puede llegar a ser del 15 al 20 % si no se instaura un tratamiento antibiótico adecuado (Edelstein 1995). En los casos nosocomiales la frecuencia oscila entre el 0,4 y 14 % (Marrie *et al.*, 1991) y la letalidad puede llegar a ser del 40 % (Marston *et al.*, 1994) incluso alcanzar el 80 % en pacientes inmunocomprometidos sin tratamiento adecuado

(Edelstein 1995). El tratamiento antibiótico de elección es eritromicina (Edelstein, 1993), de gran eficacia y del que no se han descrito resistencias. En el caso de “Fiebre de Pontiac” el tratamiento es sintomático (OMS 1990).

La infección por *Legionella* puede ser adquirida fundamentalmente en dos grandes ámbitos, el comunitario y el hospitalario. En ambos casos la enfermedad puede estar asociada a varios tipos de instalaciones y de edificios, y puede presentarse en forma de brotes/casos agrupados, casos relacionados y casos aislados o esporádicos.

5.3. Síntomas de la enfermedad en humanos.

Legionella pneumophila infecta a los seres humanos para producir legionelosis y fiebre de Pontiac (Sanchez-Busó *et al.*, 2013). La enfermedad del legionario carece de señales o síntomas característicos, no existe un síndrome típico y no todos los que se exponen al organismo desarrollan los síntomas de la enfermedad (Yu *et al.*, 1982; Macfarlane *et al.*, 1984; Granados *et al.*, 1989; Roig *et al.*, 1991; Sopena *et al.*, 1998; Ruíz; 1999; Gupta *et al.*, 2001). Sin embargo, hay varias señales clínicas que están asociadas generalmente con la enfermedad del legionario y no con otras causas de neumonía.

La enfermedad del legionario comienza a manifestarse con un cuadro de anorexia, malestar y letargo; además, los pacientes desarrollan una tos leve y no productiva. Aproximadamente la mitad de los pacientes desarrollan esputo con pus, y cerca de un tercio desarrolla esputo con sangre o tos fuerte con sangre (hemoptisis). Un dolor en el tórax, el cual puede ser pleurítico (es decir, el que produce una infección en las paredes del pulmón) o no pleurítico, se observa en un 30 % de los pacientes y podría llevar a un diagnóstico erróneo y malinterpretarse como coágulos de sangre en los pulmones cuando se relaciona con la hemoptisis. Los síntomas gastrointestinales son prominentes, la mitad de los pacientes presenta diarrea líquida y entre un 10 % y 30 % sufren náusea, vómito y dolores abdominales. Además, la fiebre se presenta en casi todos los casos y la que se asocia con escalofríos suele manifestarse durante el primer día.

Casi la mitad de los pacientes sufren de trastornos relacionados con el sistema nervioso como por ejemplo: confusión, delirio, depresión, desorientación y alucinaciones, los cuales pueden manifestarse durante la primera semana. Un examen físico revelará leves o toscos

temblores de las extremidades, reflejos hiperactivos, ausencia significativa de los reflejos de los tendones y síntomas de disfunción cerebral.

La fiebre de Pontiac es una enfermedad aguda, autolimitada; similar a la influenza sin neumonía (no neumónica). A diferencia de la enfermedad del legionario, la fiebre de Pontiac cuenta con un alto índice de ataques, los cuales afectan hasta un 95 % de las personas que se exponen a dicha enfermedad (Glick *et al.*, 1978).

Los síntomas de esta enfermedad son: pérdida de fuerza (astenia), cansancio, fiebre alta y escalofríos, dolores musculares (mialgia), dolor de cabeza, dolor articular (artralgia), diarrea, náusea, vómito (en una pequeña proporción de las personas), dificultad para respirar (disnea) y tos seca.

5.4. Agentes etiológicos

Pese a que *L. pneumophila* suele ser la causante de la legionelosis, en algunos casos se podría presentar uno o más organismos adicionales dando como resultado una infección mixta (polimicrobiana). El cultivo de estas coinfecciones ha revelado un amplio espectro de organismos, incluidos las bacterias aeróbicas (bacterias que requieren oxígeno libre, como la *Mycobacterium tuberculosis*), las bacterias anaeróbicas (bacterias que no necesitan la presencia del oxígeno), virus y hongos (Ruig *et al.*, 2003).

En la fiebre de Pontiac según el agente causante podría, en casos extremos, no ser tan benigna como se había pensado anteriormente (Jones *et al.*, 2003). También se ha relacionado la fiebre de Pontiac con la producción de endotoxinas (Fields *et al.*, 2001).

Las endotoxinas pueden ser extremadamente tóxicas para el ser humano, pues causan fiebre, shock, e incluso la muerte. Es frecuente encontrar endotoxinas relacionadas con conteos de placas heterótrofas altas (exámenes empleados para estimar el número total de todos los tipos de bacterias en una muestra del medio ambiente). Por lo tanto, conviene llevar a cabo mayores investigaciones para establecer si la endotoxina desempeña un papel en la fiebre de Pontiac, cuando también se presenta la *Legionella*. En Escocia, *L. micdadei* provocó un brote con síntomas de la fiebre de Pontiac, la cual se denominó fiebre Lochgoilhead (Goldberg *et al.*, 1989).

5.5. Datos clínicos de la legionelosis

Para causar la enfermedad, la bacteria debe ser virulenta, estar presente en cantidades suficientes, ser dispersada desde sus reservorios y alcanzar el fondo del pulmón. Una vez allí, la bacteria puede evadir las defensas del huésped parasitando células fagocitarias.

Legionella es un agente oportunista capaz de causar la enfermedad en personas especialmente susceptibles. Los factores de riesgo individual son los siguientes:

- Edad avanzada (> 50 años).
- Sexo masculino.
- Tabaquismo (cigarrillos).
- Alcoholismo.
- Individuos inmunodeprimidos o inmunocomprometidos.
- Padecer diabetes, cáncer.
- Estar sometido a tratamiento de diálisis, haber recibido un trasplante, estar en tratamiento con corticoesteroides.
- Enfermedades respiratorias crónicas. No obstante, los individuos sanos también pueden padecer la enfermedad si han sufrido una exposición a concentraciones suficientemente elevadas del agente infeccioso.

La entrada de *Legionella* en el organismo humano se produce básicamente por inhalación de aerosoles que contengan un número suficiente de bacterias (Figura 7) (Baskerville *et al.*, 1981; Hoge *et al.*, 1991), no habiendo evidencia de su posible transmisión de persona a persona (Yu *et al.*, 1983), ni de la existencia de reservorios animales conocidos.

Para que se produzca infección en el hombre se tienen que dar una serie de requisitos (Colbourne *et al.*, 1988, Pelaz *et al.*, 1993):

- Que el microorganismo tenga una vía de entrada a la instalación. Esto suele producirse por aporte de aguas naturales contaminadas por la bacteria, normalmente en pequeñas cantidades.
- Que se multiplique en el agua hasta conseguir un número de microorganismos suficientes como para que sea un riesgo para personas susceptibles. La multiplicación es función de la temperatura del agua, de su estancamiento y de la presencia de otros contaminantes, incluyendo la suciedad en el interior de las instalaciones.
- Que se disperse en el aire en forma de aerosol a partir del sistema. El agua contaminada representa un riesgo solamente cuando se dispersa en la atmósfera en forma de aerosol (dispersión de un líquido o un sólido en el aire o en un gas). El riesgo aumenta cuando se reduce el tamaño de las gotas en suspensión, porque las gotas quedan en suspensión en el aire más tiempo y sólo gotas de tamaño inferior a 5µm penetran en los pulmones.
- Que sea virulento para el hombre, ya que no todas las especies o serogrupos están igualmente implicados en la producción de enfermedad.
- Que individuos susceptibles sean expuestos a aerosoles conteniendo cantidad suficiente de *Legionella* viable.

En el ámbito hospitalario, el riesgo de adquirir la enfermedad después de la exposición a agua contaminada depende del tipo e intensidad de la exposición, así como del estado de salud de la persona. Presentan un mayor riesgo enfermos inmunocomprometidos y pacientes con enfermedades crónicas, tales como insuficiencia renal crónica y hemopatías malignas. Enfermos con riesgo moderado son diabéticos, pacientes con enfermedad pulmonar crónica, enfermos con hemopatías no malignas, fumadores, ancianos (Marston *et al.*, 1994). Los hoteles también son lugares comunes en los que la legionelosis esporádica o epidémica se puede detectar (Erdogan *et al.*, 2013).

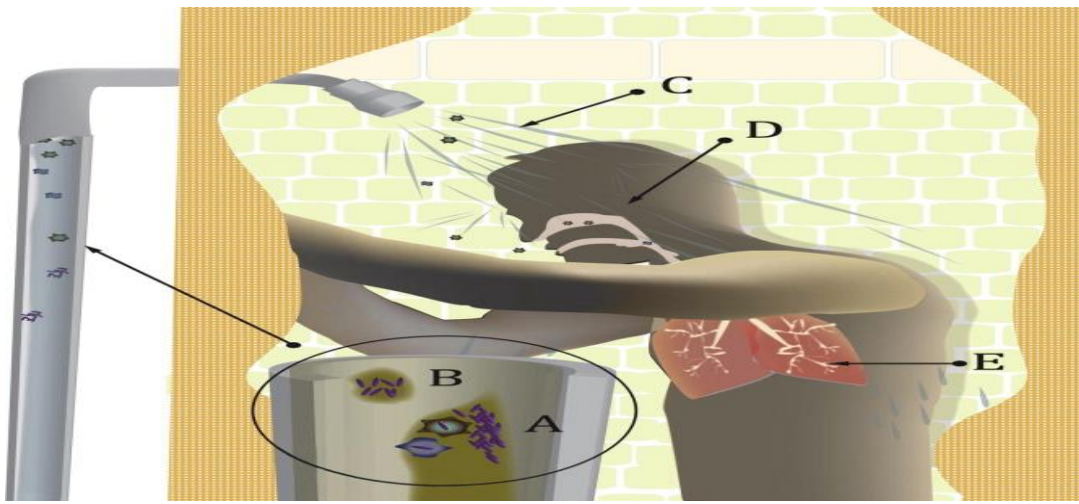


Figura 7. Modelo conceptual de inhalación de *Legionella* desde aerosoles de las regaderas. En primer lugar, *Legionella* se multiplican dentro de las biopelículas que se forman en la fontanería, *Legionella* fagocita a protozoarios o amebas(A). *Legionella* se separa de la biopelícula durante la expulsión de agua (B), es transportado a la cabeza regadera, y es aerosolizada (C). Finalmente, el aerosol conteniendo *Legionella* es inhalado (D) y una fracción de la dosis inhalada se depositó en la región alveolar de los pulmones (E). Tomada el 27 de marzo del 2013 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135411004684>.

Los casos se considerarán confirmados o sospechosos según los resultados de diagnóstico microbiológico del laboratorio:

Caso confirmado: Es aquél compatible con la definición clínica de caso y cualquiera de los diagnósticos microbiológicos considerados de confirmación:

- Aislamiento de cualquier especie o serogrupo de *Legionella* a partir de secreciones respiratorias, tejido pulmonar o sangre.
- Seroconversión (aumento del título de anticuerpos en cuatro veces o más hasta un segundo título mínimo de 128) frente a *L. pneumophila* serogrupo 1, por inmunofluorescencia indirecta, en sueros tomados en la fase aguda y convaleciente de la enfermedad.
- Inmunofluorescencia directa específica para *L. pneumophila* serogrupo 1 en secreciones bronquiales o tejido pulmonar.
- Demostración de antígenos de *L. pneumophila* serogrupo 1 en orina por ELISA o RIA.

6. INMUNOLOGIA

Las investigaciones recientes han seguido documentando que se producen respuestas inmunitarias tanto humorales como mediadas por células a la infección por *Legionella*. Aunque se producen anticuerpos específicos, la protección que proporcionan estos anticuerpos *in vivo* es aún desconocido. La inmunidad celular es reconocida actualmente como la principal defensa contra la infección por *Legionella*. La investigación también ha puesto de relieve la importancia de citocinas específicas (por ejemplo el interferón y el factor de necrosis tumoral) en la resistencia del huésped a la infección por *Legionella*. Se necesita mucha más investigación para entender los mecanismos del huésped de resistencia a estas bacterias.

Tanto la respuesta humoral y la respuesta inmune mediada por célula a infecciones por *Legionella* han sido documentadas (EPA 1985; Friedman *et al.*, 1998). Basándose en los resultados de las pruebas serológicas, los anticuerpos son producidos en respuesta a infecciones por *Legionella* que interactúan con los componentes específicos de las bacterias. Además, los resultados de la infección bacteriana en la activación del complemento, se ha demostrado que se producen tanto a través de la vía clásica y alternativa (Mintz *et al.*, 1992). Se ha demostrado que la opsonización de bacterias (es decir, unión de anticuerpos y / o complemento de las bacterias) incrementa la fagocitosis por los monocitos sanguíneos periféricos humanos y macrófagos de animales, sin embargo, la capacidad de las bacterias de replicarse dentro de estas células no parece estar disminuida (Friedman *et al.*, 1988). Por lo tanto, la protección proporcionada por los anticuerpos específicos *in vivo* no se conoce actualmente.

El factor de necrosis tumoral desempeña un papel importante en la resistencia a la infección por *Legionella*, que es una citocina secretada por los macrófagos. Blanchard y cols. (1988) informaron que los leucocitos polimorfonucleares tratados con factor de necrosis tumoral, mostraron un mayor actividad bactericida frente a *L. pneumophila*. Matsiota-Bernard y cols. (1993) informaron que el tratamiento de los monocitos humanos con el factor de necrosis tumoral inhibió significativamente el crecimiento de *L. pneumophila*. El mecanismo por el cual el factor de necrosis tumoral inhibe el crecimiento bacteriano no ha

sido establecido, aunque una propuesta es que esta citocina puede potenciar la liberación de óxido nítrico (Susa *et al.*, 1998; Skerrett *et al.*, 1996).

La inmunidad celular es reconocida como la principal defensa a la infección por *Legionella* (Susa *et al.*, 1998). La investigación indica que las citocinas secretadas por las células Th1 cooperadoras o macrófagos juegan un papel primario en la limitación de la replicación bacteriana. Por ejemplo, la interleucina-2, que es secretada por las células Th1 ayuda a activar las células asesinas naturales para lisar las células infectadas con *Legionella*, lo que limita el crecimiento bacteriano por matar la célula huésped (Friedman *et al.*, 1998).

El interferón, es también un componente esencial en la resistencia del huésped a la infección por *Legionella*. Esta citocina, la cual también es secretada por las células Th1 cooperadoras, parece activar los macrófagos y los monocitos para inhibir el crecimiento bacteriano. De hecho, se ha mostrado que el crecimiento bacteriano disminuye 100 veces en activación de macrófagos comparada con los macrófagos infectados no activados.

El crecimiento limitado puede ser el resultado de la baja regulación de los receptores de transferrina, lo que resulta en una disminución de disponibilidad de hierro intracelular, un componente esencial en el crecimiento de *Legionella* (Susa *et al.*, 1998).

Muchos estudios han confirmado el rol importante de interferón en la resistencia a la infección de *Legionella*. Por ejemplo, basándose en una comparación de los ratones viejos a ratones jóvenes, Fujio y col (1995) propusieron que la susceptibilidad de los ancianos a la infección por *Legionella* puede ser el resultado de una disminución de la capacidad de producir interferón. Finalmente, Heath y col (1996) investigaron el efecto de la infección por *Legionella* en ratones BALB/c (una especie resistente) y en ratones BALB/c donde el interferón fue interrumpido. Los ratones fueron inoculados por vía intratraqueal con *L. pneumophila*. El crecimiento de bacterias no fue observado en los ratones BALB/c, sin embargo, los ratones BALB/c mutantes desarrollaron infección intrapulmonar por *L. pneumophila* con diseminación extrapulmonar de las bacterias al bazo. Estos resultados confirman la importancia de interferón en la resistencia a la infección por *Legionella*.

7. PRUEBAS DIAGNOSTICAS

Las especies de *Legionella* pueden identificarse por una variedad de métodos. Estos incluyen la inmunofluorescencia (IF) con anticuerpos poli o monoclonales, aglutinación en porta o con partículas de látex, ensayos con anticuerpos género-específicos mediante *dot-blot* en colonias y amplificación específica del ADN mediante técnicas de PCR. También se pueden utilizar algunas pruebas bioquímicas, aunque no suelen ser muy útiles debido a que aportan resultados variables.

Recientemente se han desarrollado también métodos de secuenciación de fragmentos de genes, utilizando como dianas el gen 16S ribosomal o el gen *mip* (*macrophage infectivity potentiator*). La identificación se realiza por comparación de la secuencia obtenida con las secuencias conocidas e incluidas en las bases de datos de secuencias existentes. En el caso del fragmento 16S ribosomal se utiliza la base de datos "Gene Bank Database" (NCBI, 2013) y en el caso del gene *mip* la base de datos del Grupo Europeo de Trabajo sobre Infecciones por *Legionella* por sus siglas en inglés The European Working Group for *Legionella* Infections (EWGLI 2013) (www.ewgli.org).

7.1. Inmunofluorescencia directa

La microscopía directa con anticuerpos fluorescentes (inmunofluorescencia directa) es un método rápido y fue el primer método diagnóstico usado para detectar *Legionella pneumophila* en tejido pulmonar y secreciones respiratorias (Fundora *et al.*, 2013).

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

La sensibilidad de la IFD es variable según los distintos estudios pero siempre considerablemente menor que la del cultivo, y poco conocida para especies distintas a *L. pneumophila*. En secreciones del tracto respiratorio inferior, se han informado

sensibilidades desde un 25 % (Zuravleff, 1983) hasta un 62 % (Edelstein, 1980) o un 68 % (Saravolatz, 1981) en el mejor de los casos.

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

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

7.2. Serología

El diagnóstico serológico es una herramienta epidemiológica válida pero sólo permite un diagnóstico retrospectivo, por lo que tiene poca repercusión en la decisión clínica. En la mayoría de los casos, un incremento de cuatro órdenes en el título de anticuerpos es detectado en 3 a 4 semanas, pero en otros casos, esto puede llevar más de 10 (Monforte *et al.*, 1988).

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

7.3. Antígeno urinario

La detección de antígeno de *Legionella* soluble en muestras de orina es un método rápido que proporciona un diagnóstico rápido de la infección de *Legionella* y ha sido una herramienta útil para la investigación de los brotes de legionelosis (Wever *et al.*, 2000). El test del antígeno en orina es actualmente una herramienta establecida y válida para el diagnóstico de la enfermedad del legionario, particularmente en las regiones donde *L.*

pneumophila serogrupo 1 es la causa más común de la enfermedad. En los lugares donde sólo una pequeña parte de las infecciones son causadas por esta bacteria, el test presenta una menor contribución.

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

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

7.4. Detección de *Legionella* spp. mediante PCR

El género *Legionella* comprende aproximadamente 52 especies, y al menos 7 de los cuales tienen más de un serotipo (Ratcliff *et al.*, 1997). Aproximadamente la mitad de las especies se han asociado con la enfermedad humana (O'Connell *et al.*, 1996). *Legionella* como los organismos aislados a partir de muestras clínicas, o desde el medio ambiente durante el curso de un brote, necesitan ser identificados para explicar el proceso de la enfermedad y para identificar la fuente. Sin embargo, la determinación y especiación de cepas de *Legionella* es difícil, incluso con las técnicas más exitosas. Un esquema de clasificación genotípica basada en la secuencia informó que la orientación del potenciador de la infectividad del macrófago o por sus siglas en inglés, macrophages infectivity potentiator (mip) es de aproximadamente 700 pares de bases de nucleótidos, la utilización de la amplificación del gen y la secuencia de amplificación directa, permite la amplificación específica de pequeñas cantidades del DNA de *Legionella* spp. proporcionando resultados

en un corto período de tiempo y tiene el potencial de detectar infecciones causadas por cualquier especie y serogrupo de *Legionella* (Murdoch, 2003). El resultado de la amplificación se ha visualizado mediante tinción de los productos de la reacción con bromuro de etidio en electroforesis con geles de agarosa, o bien, mediante sondas de hibridación inmovilizadas en membranas de nylon con cebadores biotinilados (Fields, 2002).

Los esquemas filogenéticos basados en secuencias de genes (genotipo) se han utilizado ampliamente para los organismos que son difíciles de clasificar, a medida que más secuencias se han determinado y los métodos de secuenciación se han vuelto más simple, más accesible y rentable (Ruimy *et al.*, 1994). Muchos esquemas genotípicos utilizan variación en la secuencia de ARNr 16S (Sallen *et al.*, 1996), debido a la facilidad con la que las regiones se pueden amplificar y secuenciados con cebadores universales. Las secuencias de 16S rRNA de *Legionella* especies han sido reportadas (Hookey *et al.*, 1996), al igual que las secuencias del gen mip (Ratcliff *et al.*, 1997), que codifica para una inmunofilina de la proteína de unión (FKBP) clase de FK506 (Hacker *et al.*, 1993). Esta proteína, que varía en tamaño de 232 a 251 aminoácidos, dependiendo de la especie de *Legionella*, es una proteína de membrana externa importante en el ciclo intracelular de *Legionella*. Se sabe que está involucrada con la supervivencia de la bacteria inmediatamente después de la absorción en las células fagocíticas (Doyle *et al.*, 1998), su papel exacto no está claro. Otras secuencias de genes se han determinado para *Legionella* (Segal *et al.*, 1997), pero sólo las secuencias de RNAr y el gene mip se han determinado ampliamente para la mayoría de las especies, un requisito previo esencial para cualquier gen a ser la base de un esquema de determinación del genotipo. Ratcliff y cols. (1997) compararon filogenéticamente la mayoría de las especies de *Legionella*, utilizando la variación entre especies tanto en el gen 16S RNAr y gen mip, encontrando más del doble de la variación en el gen mip a nivel del ADN (56 % de los sitios de bases) como en el ARNr 16S (23 % de los sitios de base). Una comparación por pares de especies revela un gene mip, de 3 a 31 % (20 %) entre pares de especies en comparación con 1 a 10 % (6 %) para ARNr 16S. Para el gene mip, la variación entre especies de nucleótidos se produjo en todo el gen, pero especialmente dentro de un inserto hipervariable de hasta 51 bases inmediatamente adyacentes a la región codificante para la secuencia señal, en los

redundantes terceros sitios de los codones, y en secuencias que codifican para cualquiera de las regiones individuales o de pequeños aminoácidos variables intercalados entre las regiones de codificación para la homología total o casi total de aminoácidos, especialmente hacia el extremo 3' del gen. Estas últimas regiones son conocidas para codificar las porciones activas de peptidilprolil enzimática de la proteína cis-trans -isomerasa (PPIasa) (Ratcliff *et al.*, 1997).

La técnica de PCR se lleva a cabo a partir de una alineación de las secuencias del gen mip, donde los cebadores directo e inverso serán elegidos para dirigir el sitio de unión ribosómica abierta o región marco de lectura y el sitio PPIase, respectivamente, para amplificar un fragmento de 661 a 715 bases, de gene mip, dependiendo de la presencia y el tamaño de la región hipervariable, que es dependiente de las especies. Esto equivale a casi el 90% del gen a partir del extremo 5'. Mientras que la secuencia de aminoácidos deducida está altamente conservada en las regiones seleccionadas, estos primers necesitan redundancias para presentar variación en el tercer sitio del codón.

También se utiliza la amplificación del gen 16S RNAr para la identificación del género *Legionella*. La PCR puede realizarse en todo tipo de muestras clínicas: muestras respiratorias, células mononucleares de sangre periférica, orina y suero. La posible aplicación de la técnica PCR en muestras no-respiratorias es atractiva, ya que solucionaría el hecho de la dificultad de producir esputos por los pacientes (Ratcliff *et al.*, 1998; Templeton *et al.*, 2003; Yong *et al.*, 2010).

8.- TRATAMIENTO CLINICO

Sólo se han llevado a cabo unos cuantos estudios clínicos controlados de tratamiento con antibióticos para erradicar la enfermedad del legionario, sin embargo, las pruebas existentes del tratamiento es limitada. Un pequeño estudio clínico mostró que el tratamiento con fluoroquinolona pefloxacina brinda a los pacientes un índice de sobrevivencia mayor que el tratamiento con eritromicina (Dournon *et al.*, 1990).

El nuevo antibiótico macrólido, por ejemplo la claritromicina y la azitromicina, son más eficaces en la actividad *in-vitro* y tienen una mejor penetración intracelular y del tejido que la eritromicina, al igual que la quinolona. Los antibióticos betalactámicos no son eficaces contra la enfermedad del legionario, pero son la primera opción de antibióticos contra la neumonía neumocócica y son empleadas junto con los macrólidos para tratar una neumonía grave. Debido a que no se utiliza una prueba rápida de diagnóstico para la enfermedad del legionario, muchas personas que presentan un cuadro de esta enfermedad son tratadas con macrólidos, además de los antibióticos betalactámicos, ya que una demora en la aplicación de una terapia apropiada contra la neumonía de la *Legionella* aumentaría de manera significativa la mortalidad (Stout *et al.*, 1997).

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

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

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

Los principales efectos adversos de un tratamiento macrólido incluyen, síntomas gastrointestinales, como diarrea, vómito y efectos en los oídos (cuando se suministran dosis altas). Con relativa frecuencia, las quinolonas respiratorias provocan efectos adversos como síntomas gastrointestinales y trastornos en el sistema nervioso central. Los cambios del electrocardiograma (ECG o EKG) (por ejemplo: prolongación del intervalo QT, es decir la duración de la contracción de las principales cámaras del corazón) impide el uso de las quinolonas en pacientes con un grave desequilibrio electrolítico, arritmia, o una grave insuficiencia cardíaca congestiva. Además, la eritromicina según algunos informes, provoca fibrilación ventricular (contracción espasmódica desorganizada del músculo del corazón) y prolongación QT, se debe emplear con precaución en pacientes enfermos del corazón, en especial cuando la medicina se administra muy rápido en el torrente sanguíneo a través de un catéter venoso central.

9. EPIDEMIOLOGIA

La incidencia de neumonías causadas por *Legionella* presenta una gran variación entre los diferentes estudios, variando según distintas series, desde el 1 % hasta el 40 % (Barlett, 1998). Este rango tan amplio depende del tipo de neumonía estudiado, de las características de los grupos y poblaciones estudiadas, de la temporalidad del estudio y, especialmente, de los criterios y medios diagnósticos empleados. La enfermedad muestra una distribución mundial con representación en América del Norte, Suramérica, Asia, África, Australia y Europa (Gea-Izquierdo *et al.*, 2012)

Formas de presentación

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

Cadena epidemiológica

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

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

durante todo el año hay notificaciones, la mayor parte de los casos esporádicos y brotes comunitarios se produce a finales del verano y el otoño, debido presumiblemente a que el microorganismo prolifera mejor en los reservorios acuáticos durante los meses de calor.

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

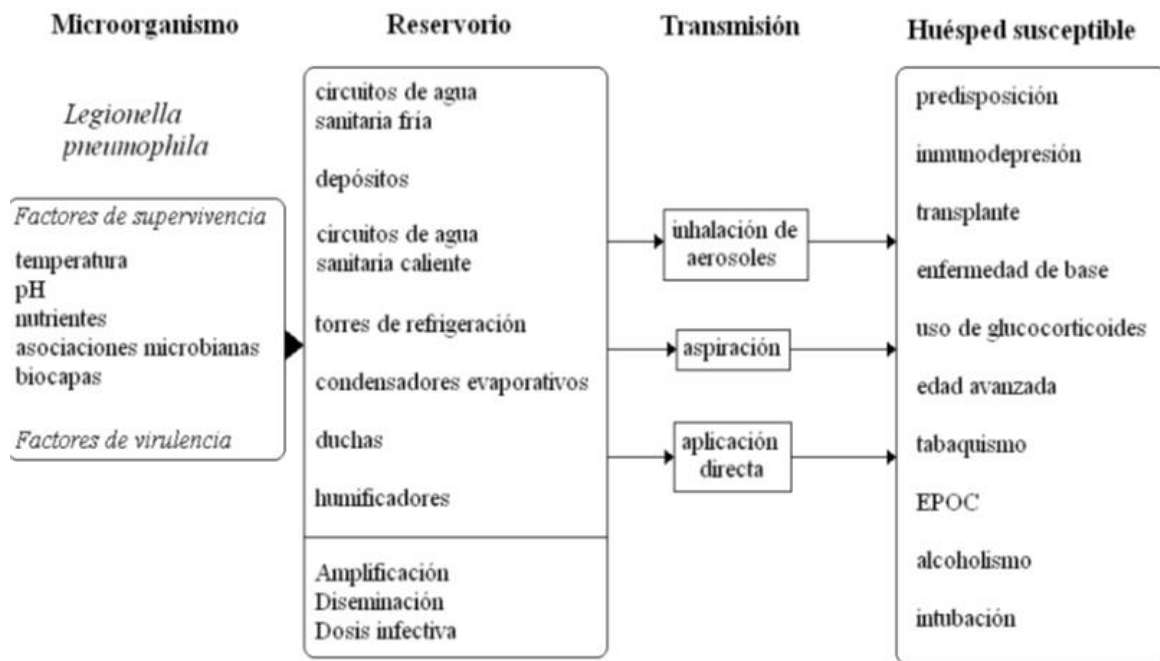


Figura 8. Esquema de la cadena epidemiológica de la enfermedad del legionario (Fields, 2002).

La inhalación de aerosoles se considera la vía de transmisión de mayor trascendencia epidemiológica. Existe una amplia documentación de legionelosis asociadas a la inhalación de aerosoles diseminados por torres de refrigeración y condensadores evaporativos, si bien no se conoce con certeza el riesgo que cabe atribuir a estas instalaciones en la generación

de la enfermedad. Esta vía de diseminación tiene especial importancia en los brotes de legionelosis comunitaria y en los casos esporádicos, pero es menos relevante en el ámbito hospitalario (Vaqué *et al.*, 2002).

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

Mediante estas vías de transmisión, las partículas microbianas pueden llegar al alveolo pulmonar, donde quedan retenidas y pueden producir la enfermedad. Como último posible modo de transmisión, hay que hablar de la aplicación directa del microorganismo en áreas corporales susceptibles. Aunque es muy infrecuente, este mecanismo se puede dar en situaciones como la utilización de agua contaminada durante el lavado de una herida quirúrgica (Vaqué *et al.*, 2002).

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

10.- PREVENCIÓN Y CONTROL DE *Legionella* spp.

La evaluación y el control de la *Legionella* spp. es tema en constante renovación que en algunos países adopta gran importancia, donde quizás exista cierta relación entre el desarrollo de la enfermedad y el nivel de industrialización. Existen otros en los que, o no se conocen casos, o no están descritos, mientras que en alguno es un hecho infrecuente (Gea-Izquierdo *et al.*, 2012). En concreto, la vigilancia continua; la definición de estrategias, y su puesta en práctica; pueden mostrar resultados positivos para la prevención de la legionelosis (Kelly *et al.*, 2003).

Las medidas preventivas irán encaminadas a impedir el desarrollo de la bacteria, modificando las condiciones de vida que le son favorables (nutrientes, agua, temperatura, etc.), y a reducir la exposición minimizando la generación de aerosoles. Se resumen a continuación las principales medidas preventivas:

- El control de la temperatura del agua mediante el uso de aislamientos térmicos, en el sentido de evitar que ésta permanezca entre los 20 °C y los 45 °C, intervalo de máximo desarrollo.
- La limitación de los nutrientes disponibles, por ejemplo, mediante la selección de materiales que no sean adecuados para el desarrollo de *Legionella* (se evitará el uso de madera, cuero, plásticos y ciertos tipos de gomas y masillas), y que sean resistentes a la acción de los desinfectantes.
- La eliminación de zonas de estancamiento del agua (tramos ciegos, tuberías, etc.), en las que los tratamientos de desinfección no son tan eficaces y pueden provocar la recolonización del sistema.
- La disposición de elementos separadores de gotas en los aparatos en los que se generan los aerosoles, la cantidad de agua arrastrada debería ser inferior al 0,1 % del caudal de agua en circulación.
- La ubicación y orientación de las tomas de aire exterior, teniendo en cuenta los vientos dominantes, de modo que se impida el reingreso de aerosoles procedentes de las torres de

refrigeración y la propia ubicación de esos equipos lejos de las tomas de aire, ventanas o zonas muy frecuentadas.

- La existencia de accesos que permitan la fácil inspección y limpieza de todos los equipos. (http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/501a600/ntp_538.pdf).

En caso de brote de legionelosis, se debe acudir de inmediato al médico para recibir el tratamiento y realizar una desinfección de toda la red, incluyendo el sistema de distribución de agua, siguiendo el siguiente procedimiento. Clorar con 15 mg/l de cloro residual libre, manteniendo el agua por debajo de 30 °C y a un pH de 7 a 8, y mantener durante 4 horas (alternativamente se podrán utilizar cantidades de 20 ó 30 mg/l de cloro residual libre, durante 3 ó 2 horas, respectivamente). Neutralizar, vaciar, limpiar a fondo los depósitos, reparar las partes dañadas, aclarar y llenar con agua limpia. Reclarar con 4 o 5 mg/l de cloro residual libre y mantener durante 12 horas. Esta cloración debería hacerse secuencialmente, es decir, distribuyendo el desinfectante de manera ordenada desde el principio hasta el final de la red. Abrir por sectores todos los grifos y duchas, durante 5 minutos, de forma secuencial, comprobar en los puntos terminales de la red 1 a 2 mg/l de cloro libre residual. Los elementos desmontables, como grifos y duchas, se limpiarán a fondo con los medios adecuados que permitan la eliminación de incrustaciones y adherencias y se sumergirán en una solución que contenga 20 mg/l de cloro residual libre, durante 30 minutos, aclarando posteriormente con abundante agua fría.

Los elementos difíciles de desmontar o sumergir se cubrirán con un paño limpio impregnado en la misma solución durante el mismo tiempo. Es necesario renovar todos aquellos elementos de la red en los que se observe alguna anomalía, en especial aquellos que estén afectados por la corrosión o la incrustación.

Proceder posteriormente al tratamiento continuado del agua durante tres meses de forma que, en los puntos terminales de la red, se detecte de 1 a 2 mg/l de cloro residual libre para el agua fría. Estas actividades quedarán reflejadas en el registro de mantenimiento. Posteriormente se continuará con las medidas de mantenimiento habituales. (http://www.msc.es/ciudadanos/saludAmbLaboral/agenBiologicos/pdfs/2_leg.pdf).

Cuadro 4. Protocolo de desinfección del agua en caso de brote

DESINFECCIÓN QUÍMICA	DESINFECCIÓN TÉRMICA
<p>Clorar toda la red con 15 mg/l de cloro residual libre, manteniendo el agua por debajo de 30 °C y con un pH de 7 a 8. Se mantendrá durante un periodo de 4 horas.</p> <p>Como alternativa, se puede clorar el sistema con 20-30 mg/l, manteniendo estos niveles durante 3 a 2 horas respectivamente.</p> <p>Neutralizar la cantidad de cloro libre residual y vaciar el agua del sistema.</p> <p>Limpiar a fondo las paredes de los estanques de acumulación, realizar las reparaciones necesarias en los mismos y aclararlos con agua limpia.</p> <p>Reclarar con 4 o 5 mg/l de cloro libre residual y mantener durante 12 horas, abriendo de manera secuencial todos los terminales de la red comprobando que la concentración en estos puntos sea 1 a 2 mg/l.</p> <p>Vaciar los tanques de acumulación y volver a llenarlos.</p>	<p>En el caso de disponer de depósitos:</p> <p>Vaciar el sistema, limpiar a fondo las paredes de los estanques de acumulación, realizar las reparaciones necesarias en los mismos y aclararlos con agua limpia.</p> <p>Llenar el depósito acumulador y elevar la temperatura del agua hasta 70 °C durante 4 horas, dejando correr el agua en los puntos terminales de la red durante 10 minutos de forma secuencial de manera que se alcance en todos los terminales de la red una temperatura de 70 °C.</p> <p>Vaciar los depósitos de acumulación y volver a llenarlos.</p> <p>En el caso de sistemas sin depósitos:</p> <p>Elevar la temperatura y dejar correr el agua en los puntos terminales de la red de forma secuencial hasta que se alcance en todos los puntos una temperatura de 70 °C y mantener durante 3 minutos.</p> <p>Los equipos que no puedan alcanzar la temperatura requerida deberán realizar una desinfección química.</p>

BIBLIOGRAFIA

Abu-Kwaik Y, Young Gao L, Stone BJ, Venkataraman C, Harb OS. (1996). Invasion of Protozoa by *Legionella pneumophila* and Its Role in Bacterial Ecology and Pathogenesis. *Appl Environ Microbiol* **64**:3127–3133.

Adeleke A, Pruckler J, Benson R, Rowbotham T, Halablab M, Fields BS. (1996). *Legionella*-like amebal pathogens—phylogenetic status and possible role in respiratory disease. *Emerging Infectious Diseases*, **2**: 225–230.

Atlas RM, Bartha R. (2002). Ecología microbiana y microbiología ambiental. Madrid. *Pearson Educacion*. **11**:475-8.

Atlas RM. (2009). *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. **1(4)**, 283-293.

Barbaree JM, Fields BS, Feeley JC, Gorman GW, Martin WT. (1986). Isolation of protozoa from water associated with a legionellosis outbreak and demonstration of intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* **131**:1383-1391.

Bartlett JG, Breiman RF, Mandell LA, File TM Jr. (1998). Community-acquired pneumonia in adults: guidelines for management. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* **65(11)**:4892-4896.

Bargellini, A, Marchesi, E, Leoni A, Mansi S, Cristino AM, Marcelloni and P. Borella. (2010). Inter-laboratory validation of a rapid assay for the detection and quantification of *Legionella* spp. in water samples. *Letters in Applied Microbiology* 0266-8254.

Barker J, Brown MR, Collier PJ, Farrell I, Gilbert P. (1992). Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2420-5.

Blanchard DK, Djeu JY, Klein TW, Friedman H. (1988). Protective effects of tumor necrosis factor in experimental *Legionella pneumophila* infections of mice via activation of PMN function. *J Leukoc Biol.* **43(5)**: 429-435.

Bellinger-Kawahara C, Horwitz MA. (1990). Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. *J Exp Med.* **60**:1585–1592.

Benson RF, Fields BS. (1998). Classification of the genus *Legionella*. *Semin Respir Infect.*

Bernard PM, Lefebvre C, Sedqui M, Cornillet O, Guenounou M. (1993). Involvement of tumor necrosis factor alpha in intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in human monocytes. **14**:255–261.

Berk SG, Ting RS, Turner GW, Ashburn RJ. (2008). Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol Jan*; **64**(1):279–286.

Breiman RF, Cozen W, Fields BS, Mastro TD, Carr SJ, Spika JS, Mascola L. (1990). Role of Air Sampling in Investigation of an Outbreak of Legionnaires' Disease Associated with Exposure to Aerosols from an Evaporative Condenser. **263**:2924-2926.

Brenner DJ, Feeley JC, Weaver RE. 1984. Family VIII Legionellaceae. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Krieg NR, Holt JG (Eds). MD. **(1)**:279.

Brieland JK, Remick DG, LeGendre ML, Engleberg NC, Fantone JC. (1997). In vivo regulation of replicative *Legionella pneumophila* lung infection by endogenous interleukin-12. *Infect Immun* **71**:5805–5813.

Borella P, Guerrieri E, Marchesi I, Bondi M, Messi P. (2005). Water ecology of *Legionella* and protozoan: environmental and public health perspectives. *Biotechnol Annu.* **69**:148-55.

Blyth C, Adams DN, Sharon C, Chen A. (2009). Diagnostic and typing methods for investigating *Legionella* infection. **3**:179-203.

Campos BS, Barbaree JM, Sanden GN. (1993). Virulence of a *Legionella anisa* strain associated with Pontiac fever: an evaluation using protozoan, cell culture, and guinea pig models. **109**:623–634.

Centers for Disease Control (CDC) (2005) Procedures for the Recovery of *Legionella* From the Environment. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services; 2005.

Cianciotto NP, Eisenstein BI, Mody CH, Toews GB, Engleberg NC. (1989). *Legionella pneumophila* gene encoding a species-specific surface protein potentiates initiation of intracellular infection. *Infect Immun*, **57**: 1255-62.

Cianciotto NP, Eisenstein BI, Mody CH, Engleberg NC. (1990). A mutation in the mip gene results in an attenuation of *Legionella pneumophila* virulence. *J Infect Dis*. **67**:3985–3993.

Cianciotto NP. (2001) Pathogenicity of *Legionella pneumophila*. *Int. J. Med. Microbiol*; **291**:331-43

Colbourne, JS, Dennis PJ, Trew RM, Berry C, Vesey G. (1988). *Legionella* and public water supplies. **63**:119–123.

Declerck P, Behets J, De Keersmaecker B, Ollevier F. (2007) Receptor-mediated uptake of *Legionella pneumophila* by *Acanthamoeba castellanii* and *Naegleria lovaniensis*. *J. Appl. Microbiol*. **55**:435–440

Dournon E, Mayaud CH, Wolff M, Schlemmer B, Samuel D, Sollet JP, Rajagopalan PL. (1990). Comparison of the activity of three antibiotic regimens in severe Legionnaires' Disease. **73**:1452–1456.

Dowling J, Asish S, Glew R. (1992). Virulence factors of the family *Legionellaceae*. *American Society for Microbiology* **56**:32-60.

Doyle RM, Steele TW, McLennan AM, Parkinson IH, Manning PA, Heuzenroeder MW. (1998). Sequence analysis of the mip gene of the soilborne pathogen *Legionella longbeachae*. *Infect Immun*; **66**:1492–1499

Drozanski W. (1963). Studies of intracellular parasites of free-living amoeba. *Acta Microbiol Pol.***12**: 3-8.

- Edagawa A, Kimura A, Doi H, Tanaka H, Tomioka K, Sakabe K, Nakajima C, Suzuki Y. (2008). Detection of culturable and nonculturable *Legionella* species from hot water systems of public buildings in Japan. *Immun.* **64**:4602–4610.
- Edelstein PH. (1982) Comparative study of selective media for isolation of *Legionella pneumophila* from potable water. *J. Clin. Microbiol.* **16**:697–699.
- Edelstein PH, Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. (2008). Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. Washington: ASM Press. **40**:2221–2229.
- Erdogan H, Arslan H. (2013). Evaluation of legionella outbreak emergent in a recently opening hotel. *Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology.* **2**:240-9.
- Fallon RJ. (1990). *Legionella*. In: Parker MT, Duerden BI, eds. Topley and Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity. London; **2**, 275–287.
- Fang GD, Yu VL, Vickers RM. (1989) Disease due to the Tesh, M.J. and Miller, R.D. (1982) Growth of *Legionella pneumophila*, *Legionellaceae* (other than *Legionella pneumophila*). *Medicine.* **68**: 3502–3512.
- Fields BS. (1996). The molecular ecology of legionellae. *Trends Microbiol.* **4**: 286-290.
- Fields BS, Benson RF, Besser RE. (2002). *Legionella* and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation, *Clin. Microbiol. Rev.* **3**: 506–526.
- Fiore AE, Pekka NJ, Levine OS. (1997). Epidemic Legionnaires disease two decades later: old sources, new diagnostic methods. *J. Clin. Investig.* **86**:817–824.
- Fliermans CB, Cherry WB, Orrison LH, Smith SJ, Tison DL, Pope DH. (1981). Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**:1165–1173.
- Fitzgeorge RB, Dennis PJ. (1983). Isolation of *Legionella pneumophila* from water supplies: comparison of methods based on guinea-pig and culture media. *J. Hygiene. Camb.* **91**: 817–824.

Fraser DW, Beubner DC, Hill DL, Gilliam DK. (1979). Nonpneumonic, short-incubation-period Legionellosis (Pontiac fever) in men who cleaned a steam turbine condenser. *Science* 205.

Friedman TW, Klein R, Widen C, Newton DK, Blanchard Y. (1988). *Legionella pneumophila* immunity and immunomodulation nature and mechanisms *Adv. Exp. Med. Biol.* **239**.

Fujio H, Kawamura I, Miyamoto H, Mitsuyama M, Yoshida S. (1995). Decreased capacity of aged mice to produce interferon-gamma in *Legionella pneumophila* infection. *Infect. Immun.* **38**:716–723.

Fundora H, Puig Y, Chiroles S, Rodriguez M, Gallardo J, Milián Y. (2013). Métodos inmunológicos utilizados en la identificación rápida de bacterias y protozoarios en aguas. *Revista cubana de higiene y epidemiología.* **1**:84-96.

Gao LY, Abu Kwaik Y. (2000). The mechanism of killing and exiting the protozoan host *Acanthamoeba polyphaga* by *Legionella pneumophila*. *Environ. Microbiol.* **2**: 4538–4549.

Gautom et al, 1995 Gautom, R., y Fritsche, T. (1995). Transmissibility of Bacterial Endosymbionts between isolates of *Acanthamoeba* spp. *Journal of Eukaryotic Microbiology.* **67**:2117–2124.

Gao LY, Abu Kwaik Y. (2000). The mechanism of killing and exiting the protozoan host *Acanthamoeba polyphaga* by *Legionella pneumophila*. *Environ. Microbiol.* **2**: 679–682.

Gea-Izquierdo E, Mezones-Holguín E, Haro-Garcia L. (2012). Acciones de prevención y control de la legionelosis: un reto para la salud pública española. *Rev Peru. Med Exp Salud Publica.* **2**:272-76.

Giao M, Azevedo N, Wilks S, Vieira M, Keevil W. (2011). Interaction of *Legionella pneumophila* and *helicobacter pylori* with bacterial species isolated from drinking water biofilms. *Cell Mol. Biol.* **28**:528–537.

Groothuis DG, Veenendaal HR, Dijkstra HL. (1985). Influence of temperature on the number of *Legionella pneumophila* in hot water systems. *J. Appl. Bacteriol*; **59**:529-36.

Goldberg DJ, Collier PW, Fallon R, McKay T, Markwick T, Wrench J, Emslie J, Fobes G, Macpherson, Reid D. (1989). Lochgoilhead fever: outbreak of non-pneumonic Legionellosis due to *Legionella micdadei*. *J. Clin. Microbiol.* **40**:1352–1362.

Glick TH, Gregg MB, Berman B, Mallison G, Rhodes WW, Kassanoff I. (1978). Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a Health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. *Am J Epidemiol.* **29**:25–33.

Gupta SK, Imperiale TF, Sarosi GA. (2001). Evaluation of the Hospital Winthrop-University criteria to identify *Legionella pneumonia*. *Infect.Immun.* **69**:6348–6363.

Greub G, Raoult D. (2004). Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev. Infect. Immun.* **75**:1364–1372.

<http://microblog.me.uk/90>. Tomada el 10 de marzo del 2013

<http://www.protecciondelasalud.com/2011/08/legionelosis-biologia-instalaciones-de.html>
Tomada el 15 de marzo del 2013

<http://newsarchive.asm.org/oct00/figs/fig1f2.htm>. Tomada el 15 de marzo del 2013

<http://www.uweb.engr.washington.edu/research/tutorials/biofilm.html>. Tomada el 22 de marzo del 2013

http://www.msc.es/ciudadanos/saludAmbLaboral/agenBiologicos/pdfs/2_leg.pdf.
Consultada el 28 de abril del 2013.

Hacker J, Fischer G. (1993). Immunophilins: structure-function relationship and possible role in microbial pathogenicity. *Mol Microbiol*; **10**:445–456.

Harb OS, Venkataraman C, Haack BJ, Gao LY, Kwaik YA. (1998). Heterogeneity in the attachment and uptake mechanisms of the Legionnaires' disease bacterium, *Legionella pneumophila*, by protozoan hosts. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2189–2196.

Harding CR, Stoneham CA, Schuelein R, Newton H, Oates CV, Hartland EL, Schroeder GN, Frankel G. (2013). The Dot/Icm effector SdhA is necessary for virulence of *Legionella pneumophila* in Galleria mellonella and A/J mice. *MRC Centre for Molecular Bacteriology and Infection. J Infect Dis.* **186**:127–128.

Heath CH, Grove DI, Looke DF. (1996). Delay in appropriate therapy of *Legionella pneumophila* associated with increased mortality. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **15**: 437–442.

Heuner K. (2002). Function and expression of *Legionella pneumophila* surface factors. In: Marre R, eds. *Legionella*. American Society for Microbiology, Washington DC; 43-48.

Herrera JM, Cruz A, Uribe A. (1998). Identificación y aislamiento de posible *Legionella* spp. como bacterias endosimbiontes de amebas de vida libre. **15**:506–526.

Hoge CW, Breiman RF. (1991). Advances in the epidemiology and control of *Legionella* infections. *Epidemiol. Rev* **13**: 2323-2330.

Hookey JV, Saunders NA, Fry NK, Birtles RJ, Harrison TG. (1996). Phylogeny of *Legionellaceae* based on small-subunit ribosomal DNA sequences and proposal of *Legionella lytica* comb. nov. for *Legionella*-like amoebal pathogens. *Int J Syst Bacteriol*; **46**:526–531

Horwitz MA, Silverstein SC. (1980). Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiplies intracellularly in human monocytes. *J. Clin. Invest.* **66**: 255–261.

Hlady GW, Mullen R, Clifford M, Shelton BG, Hopkins RS, Daikos G. (1993). Outbreak of Legionnaire's Disease Linked to a Decorative Fountain by Molecular Epidemiology. *Scand J Infect Dis.* **38**:725–728

Hui CK. (2013). Endogenous lipid pneumonia associated with *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Singapore Med J.* 54(3):e66-7.

Jeon KW. (1995). Bacterial endosymbiosis in amoebae. Trends in Cell Biology. *Appl Environ Microbiol.* **71**:5805–5813.

Jernigan DB, Hofmann MD, Centron MS, Nuorti JP, Fields BS, Benson RF, Breiman MD, Lipman HB, Carter RJ, Genese CA, Paul MD, Eldestein MD, Guerrero MD. (1996). Outbreak of Legionnaires' disease among cruise ship passengers exposed to a contaminated whirlpool spa. *Infect Immun* **67**:4427–4434.

Vogel JP, Roy C, Isberg R. (1996). Use of Salt to Isolate *Legionella pneumophila* Mutants Unable to Replicate in Macrophages. *American Society for Microbiology*. 7–11.

Katz SM, Hammel JM. (1987). The effect of drying, heat, and pH on the survival of *Legionella pneumophila*. *Ann. Clin. Lab. Sci. Clin Microbiol Rev.* **15**:506–526.

Kelly AA, Danko LH, Kralovic SM, Simbartl LA, Roselle GA. (2033). Legionella in the veterans healthcare system: report of an eight-year survey. *Epidemiol Infect.* **131**(2):835-9.

Kusnetsov JM, Ottoila E, Martikainen PJ. (1996). Growth, respiration and survival of *Legionella pneumophila* at high temperatures. *Journal of Applied Bacteriology* **81**, 34 1-347.

Kuroki T, Yagita K, Yabuuchi E. (1998). Isolation of *Legionella* and free-living amoebae at hot spring spas in Kanagawa, Japan. *Kansenshogaku. Applied and Environmental Microbiology.* **61**(2), 407–412.

Kwaik YA. (1996). The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoan *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmic reticulum. *Applied and Environmental Microbiology*, **5**:2540–2547.

Kwaik YA, Gao LY, Stone BJ, Venkataraman C and Harb OS. (1998). Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **7**:3433–3441

Maiwald M, Helbig JH, Luck PC. (1998). Laboratory methods for the diagnosis of *Legionella* Infections. **2**: 287–293.

Mastro TD, Fields BS, Breiman RF, Campbell J, Plikaytis, Spika JS. (1991). Nosocomial Legionnaires' Disease and Use of Medication Nebulizers. *Applied and Environmental Microbiology.* **2**:407–412.

- Margulis, L., y Olendzenski, L. (1992). Environmental evolution. effects of the Origin and evolution of life on planet earth. Massachusetts Institute of Technology Pres. *Environ. Microbiol.* **17**:3389-3402.
- Molmeret, M. M., Horn, M., Wagner, M., Santic, M. y Abu Kwaik, Y. (2005). Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 20-28.
- Marrie TJ, Haldane D, Bezanson G, Peppard R. (1992). Each wáter outlet is a unique ecological niche for Legionella pneumophila. *Epidemic Infect.* **2**: 422-424.
- McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus Ma, Dowdle WR.(1977). Legionnaires' diasiase: isolation of a bacterium and demonstration pf its role in other respiratory Disease. *N. Engl. J. Med.* **36**:570-576.
- Marston BJ, Lipman HB. (1994). Surveillance for Legionnaires' disease. Risk factors for morbidity and mortality. *Arch. Intern. Med.* **154**:150-163
- Marrie TJ, MacDonald S, Clarke K, Haldane D. (1991). Nosocomial legionnaires' disease: Lessons from a four-year prospective study. *Appl. Environ. Microbiol.* **11**:6826-6833.
- Monforte R, Estruch R, Vidal J, Cervera R, Urbano-Marquez A.(1988). Delayed seroconversion in Legionnaire's disease. *Lancet. J. Clin. Microbiol.* **7**:2653-2658.
- Murdoch DR. (2003) Diagnosis of *Legionella* infection . *Clin Infect Dis.* **18**:4433-4444
- Marston BJ, Lipman HB, Breiman RF. (1994). Surveillance for Legionnaires' disease. Risk Factors for morbidity and mortality. *Arch Intern Med.* **46**: 1513-21
- Mintz CS, Zou CH. (1992), Isolation and characterization of a lipopolysaccharide mutant of *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiol. Lett.* **9**:4164-4168.
- Neumeister B, Schoniger S, Faigle M, Eichner M, Dietz K. (1997) Multiplication of different *Legionella* species in Mono Mac 6 cells and in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ. Microbiol.* **63**:150-153.

O'Connell WA, Dhand L, Cianciotto NP. (1996). Infection of macrophage-like cells by *Legionella* species that have not been associated with disease. *Infect Immun*; **64**:4381–4384.

Ohno A, Kato N, Yamada K, Yamaguchi K. (2003). Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water. *Appl. Environ Microbiol.* **69**:1261-1263

Pelaz C, Martin-Bourgon C. (1993). Caracterización de los aislamientos clínicos y ambientales de *Legionella* asociados con brotes y estudio de las fuentes de infección. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* **16**:466–71.

Pine L, George JR, Reeves MW, Harrel WK. (1979). Physiology: Characteristics of the Legionnaires' disease bacterium in semisynthetic and chemically defined liquid media. *J. Clin. Microbiol.* **37**:2248-2254.

Pine L. Hoofman PS, Malcolm GB, Benson RF, Franzus MJ. (1986). Role of keto acids and reduced oxygen-scavenging enzymes in the growth of *Legionella pneumophila*. *J. Microbiol.* **23** (1):33-42.

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

Ratcliff RM, Donnellan SC, Lanser JA, Manning PA, Heuzenroeder MW. (1997). Interspecies sequence differences in the Mip protein from the genus *Legionella*; implications for function and evolutionary relatedness. *Mol Microbiol* ;**25**:1149–1158

Rathore M, Alvarez A. (2006). *Legionella infection*. In: Medicine. Clinical Knowledge Base. Institutional Edition. Medicine Specialties pediatrics infectious diseases. (Fennelly GJ, Windle ML, Lutwick LI, Tolan RW, Steele RW, eds) Medicine.com: Omaha, 1996-2006. **2**:663-671.

Riffard S. (1998). Species identification of *Legionella* via intergenic 16S–23S ribosomal spacer PCR analysis. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **48**:723–730.

Roig J, Sabria M, Pedro-Botet ML. (2003). *Legionella* spp.: community acquired and nosocomial infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **16**: 69-72.

Rogers J, Keevil CW. (1992) Immunogold and fluorescein immunolabelling of *Legionella pneumophila* within an aquatic biofilm visualized by using episcopic differential interference contrast microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **4**:269-274.

Rogers J, Dowsett AB, Dennis PJ, Lee JV, Keevil CW. (1994). Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. *Appl. Environ. Microbiol* **60**: 1585-92.

Rowbotham TJ. (1980). Preliminary report on the Pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J. Clin. Pathol.* **33**: 1179-83.

Rowbotham TJ. (1986). Current views on the relationships between amoebae, *Legionellae* and man. *Isr. J. Med. Sci.* **22**:678-689.

Ruimy R, Breittmayer V, Elbaze P, Lafay B, Boussemart O, Gauthier M, Christen R. (1994). Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences. *Int J Syst Bacteriol*; **44**:416-426.

Sallen B, Rajoharison A, Desvarenne S, Quinn F, Mabilat C. (1996). Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria* species. *Int J Syst Bacteriol*; **46**:669-674

Sánchez-Busó L, Coscollá M, Pinto-Carbó M, Catalán V, González-Candelas F. (2013). Genetic characterization of *Legionella pneumophila* isolated from a common watershed in comunidad Valencia, Spain. *CIBER Epidemiology and Public Health.* **4**:269-274.

Saravolatz LD, Russell G, Cvitkovich D. (1981). Direct immunofluorescence in the diagnosis of Legionnaires' disease. *J. Appl. Microbiol.* **3**: 837-847.

Segal G, Shuman HA. (1997). Characterization of a new region required for macrophage killing by *Legionella pneumophila*. *Infect Immun*; **65**:5057-5066.

Shin S, Roy CR. (2008). Host cell processes that influence the intracellular survival of *Legionella pneumophila*. *Cell. Microbiol.* **10**: 1267-1277.

Storey MV, Winiiecka-krusnell J, Ashbolt NJ, Stenstrom TA. (2004). The efficacy of heat and chlorine treatment against thermotolerant *Acanthamoebae* and *Legionellae*. *Scand J Infect Dis* **36**: 656-62.

Skaliy P, McEachern HV. (1979). Survival of the Legionnaires' disease bacterium in water. *Ann. Intern. Med.* **90**: 662-3.

Solomon JM, Rupper A, Cardelli JA, Isberg, RR. (2000). Intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*, a system for genetic analysis of host-pathogen interactions. *Infect. Immun.* **2**:149-160.

Steinert M, Emody L, Amann R, Hacker J. (1997). Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.*

Steele TW, Moore CV, Sangster N. (1990). Distribution of *Legionella longbeachae* serogroup 1 and other *Legionellae* in potting soils in Australia. *Appl Environ Microbiol.* **8**: 580-583.

Storey MV, Winiiecka-Krusnell J, Ashbolt NJ, Stenstrom TA. (2004). The efficacy of heat and chlorine treatment against thermotolerant *Acanthamoebae* and *Legionellae*. *Scand. J. Infect. Dis.* **36**: 3-22.

Swanson MS. (2007). Autophagy: eating for good health. *J. Immunol.* **177**:975-980.

Segal G, Shuman HA. (1999). *Legionella pneumophila* utilizes the same genes to multiply within *Acanthamoeba castellanii* and human macrophages. *Infect. Immun.* **1**:69-72.

Susa M, Ticac B, Rukavina T, Doric M, Marre R. (1998). *Legionella pneumophila* Infection in Intratracheally Inoculated T Cell-depleted or -Nondepleted A/j Mice. *J Immunol.*

Sun EW, Wagner ML, Maíz A, Kemler D, Garland-kuntz E, Xu L, Luo ZQ, Hollenbeck PJ. (2013). *Legionella pneumophila* infection of *Drosophila* S2 cells induces only minor changes in mitochondrial dynamics. *Department of Biological Sciences. FEMS Microbiol Rev.* **26**: 207–222.

States SJ, Barbaree JM, Breiman RF, Dufour AP. (1993). Temperature and the survival and multiplication of *Legionella pneumophila* associated with *Hartmannella vermiformis*. current status and emerging perspectives. Washington, DC, *American Society for Microbiology*: 147–149.

Thacker WL, Wilkinson HW, Benson RF, Brenner DJ. (1987). *Legionella pneumophila* serogroup 12 isolated from human and environmental sources. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 569-570.

Tesauro M, Bianchi A, Consonni M, Pregliasco F, Galli MG. (2010). Environmental surveillance of *Legionella pneumophila* in two Italian hospitals. *Epidemiol Infect.* **107**: 591–605.

Vickers RM, Yu VL, Hanna SS, Muraca P, Diven W, Carmen N, Taylor FB. (1987). Determinants of *Legionella pneumophila* contamination of water distribution systems: 15-hospital prospective study. *Infect. Control.* **8(9)**:357-363.

Villaseñor IR, Sapián LA. (2005). La enfermedad de los legionarios. *Epidemiología.* **8**: 22 1-3.

Veríssimo A, Marrao G, Silva FG, Costa MS. (1991). Distribution of *Legionella* spp. in hydrothermal areas in continental Portugal and the island of São Miguel, Azores. *J Clin Microbiol* **41**: 4101–4106.

Venkataraman C, Haack BJ, Bondada S, Abu Kwaik Y. (1997). Identification of a Gal/GalNAc lectin in the protozoan *Hartmannella vermiformis* as a potential receptor for attachment and invasion by the Legionnaires' disease bacterium, *Legionella pneumophila*. *J. Exp. Med.* **186**: 537–547.

Venkataraman C, Gao LY, Bondada S, Abu Kwaik Y. (1998). Identification of putative cytoskeletal protein homologues in the protozoan *Hartmannella vermiformis* as substrates for induced tyrosine phosphatase activity upon attachment to the Legionnaires' disease bacterium, *Legionella pneumophila*. *J. Exp. Med.* **168**:769–772.

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

Weissgeber P, Faigle M, Northoff H, Neumeister B. (2003). Investigation of mechanisms involved in phagocytosis of *Legionella pneumophila* by human cells. *FEMS Microbiol Lett. Curr Microbiol.* **21**:139–143.

Wever PC, Yzerman EPF, Kuijper EJ, Speelman P, Dankert J. (2000). Rapid diagnosis of Legionnaires' disease using an immunochromatographic assay for *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine during an outbreak in the Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* **63**: 2047–2053.

Winiiecka-Krusnell J, Linder E. (2001). Bacterial infections of free-living amoebae. *Res. Microbiol.* **152**; 613–619

Yu VL, Stout JE, Yee YC, Vaccarello S, Diven W, Lee TC. (1983). *Legionella pneumophila* in residential water supplies: environmental surveillance with clinical assessment for Legionnaires' disease. *International Journal of Infectious Diseases*, **12**: 416–420.

Yu VL. (2000). Nosocomial Legionellosis. *Curr opin infect dis*; **13**: 385-8.

Yu VL, Feng-Yee C. (2001). Infección por *Legionella*. En: Principios de Medicina Interna; 16(6):1117-1122.

Yong FY, Shin HT, Wee J, JhiTee J, Sansom FM, Newton HJ, Hartland E. (2010). Molecular detection of *Legionella*: moving on from mip. *17(4)*:579-583.

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