

MANUAL DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA DE LA ASOCIACIÓN ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA

VOLUMEN I

Bacterias de Importancia Clínica

Editores

HORACIO A. LOPARDO

Consultor Honorario del Servicio de Microbiología del Hospital de Pediatría
"Prof. Dr. Juan P. Garrahan"

Profesor Consulto de Microbiología Clínica. Facultad de Ciencias Exactas
Universidad Nacional de La Plata

Miembro del Grupo STREP de SADEBAC,
Asociación Argentina de Microbiología

Director de la revista Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

SILVIA C. PREDARI

Ex-Jefa del Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones
Médicas Alfredo Lanari. Universidad de Buenos Aires

Asesora de la Revista Argentina de Microbiología, publicación científica oficial de
la Asociación Argentina de Microbiología

Miembro de la Subcomisión de Bacterias Anaerobias, SADEBAC, Asociación
Argentina de Microbiología

CARLOS VAY

Profesor Asociado de Microbiología Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica.

Jefe del Laboratorio de Bacteriología, Departamento de Bioquímica Clínica.
Hospital de Clínicas "Gral. José de San Martín"

Director Carrera de Especialización en Bacteriología Clínica. Facultad de Farmacia
y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

INDICE GENERAL

Parte I. Temas generales de Microbiología Clínica

Parte Ia. Taxonomía bacteriana

Parte Ib. Métodos generales de identificación bacteriana

Partell. Microorganismos aerobios y anaerobios facultativos

Parte IIa. Cocos gram positivos

Parte IIa.1. Cocos gram positivos, catalasa positivos

Capítulo IIa.1.1. *Staphylococcus* spp.

Capítulo IIa.1.2. Otros géneros

Apéndice I. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Parte IIa.2. Cocos gram positivos, catalasa negativos

Capítulo IIa.2.1. Estreptococos β -hemolíticos

Capítulo IIa.2.2. *Streptococcus pneumoniae*

Capítulo IIa.2.3. Estreptococos del grupo viridans

Capítulo IIa.2.4. *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Lactococcus*

Capítulo IIa.2.5. *Abiotrophia*, *Granulicatella*, *Gemella*, *Aerococcus* y bacterias

Relacionadas

Apéndice II. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Parte IIb. Bacilos gram positivos

Parte IIb.1. Esporulados

Parte IIb.2. No esporulados

Capítulo IIb.2.1. *Corynebacterium* spp. y bacterias relacionadas

Capítulo IIb.2.2. *Listeria*

Capítulo IIb.2.3. *Nocardia*

Capítulo IIb.2.4. Bacilos gram positivos, catalasaneativos

Capítulo IIb.2.5. Micobacterias

Apéndice III. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Parte IIc. Bacilos gram negativos

Parte IIc.1. Enterobacterias

Capítulo IIc.1.1. Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* diarregénico

Capítulo IIc.1.2. *Shigella* spp.

Capítulo IIc.1.3. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Cronobacter*, *Raoultella* y *Serratia*.

Capítulo IIc.1.4. *Salmonella*, *Edwardsiella* y *Citrobacter*

Capítulo IIc.1.5. *Proteus*, *Morganella* y *Providencia*

Capítulo IIc.1.6. *Yersinia* y otras enterobacterias.

Apéndice IV. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Capítulo IIc.2. Bacilos gram negativos no fermentadores

Capítulo IIc.2.1. *Pseudomonas*

Capítulo IIc.2.2. *Acinetobacter*

Capítulo IIc.2.3. *Burkholderia*

Capítulo IIc.2.4. *Flavobacterium*, *Chryseobacterium* y *Elizabethkingia*

Capítulo IIc.2.5. *Stenotrophomonas*

Apéndice V. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Capítulo IIc.3. Bacilos gram negativos oxidasa positivos y fermentadores de lactosa

Capítulo IIc.3.1. *Vibrio*

Capítulo IIc.3.2. *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Chromobacterium*

Capítulo IIc.3.3. *Pasteurella*

Apéndice VI. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Capítulo IIc.4. Bacilos gram negativos exigentes

Capítulo IIc.4.1. *Haemophilus*

Capítulo IIc.4.2. Bacilos gram-negativos del grupo ACEK

Capítulo IIc.4.3. *Bordetella*

Capítulo IIc.4.4. *Brucella*

Capítulo IIc.4.5. *Helicobacter*

Capítulo IIc.4.6. *Campylobacter*

Apéndice VII. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Parte II d. Cocos gram negativos

Capítulo II d.1. *Neisseria meningitidis*

Capítulo II d.2. *Neisseria gonorrhoeae*

Capítulo II d.3. Otras neiserias y *Moraxella catarrhalis*

Apéndice VIII. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Parte II e. Bacterias atípicas I

Capítulo II e.1. *Chlamydia*

Capítulo II e.2. *Legionella*

Capítulo II e.3. Micoplasmas

Apéndice IX. Métodos de identificación: fundamento y método.

Parte II f. Bacterias atípicas II

Capítulo II f.1. *Bartonella*

Capítulo II f.2. *Rickettsia* y *Ehrlichia*

Capítulo II f.3. *Coxiella*

Capítulo II f.4. *Tropheryma whipplei*

Apéndice IX a. Métodos de identificación

Parte II g. Espiroquetas

Capítulo II g.1. *Treponema*

Capítulo II g.2. *Borrelia*

Capítulo II g.3. *Leptospira*

Apéndice IX b

Parte III Microorganismos anaerobios

Parte III a. Métodos de cultivo e identificación de microorganismos anaerobios

Parte III b. Cocos gram positivos anaerobios

Parte III c. Bacilos gram positivos anaerobios esporulados

Parte III d. Bacilos gram positivos anaerobios no esporulados

Parte III d. Bacilos gram negativos anaerobios

Parte IIIe. Cocos gram positivos y gram negativos anaerobios
Apéndice X. Pruebas bioquímicas manuales: fundamento y método.

Parte IIe
BACTERIAS ATÍPICAS I

Editor responsable

HORACIO A. LOPARDO

Prieto, Monica

Manual de Microbiología Clínica de la Asociación Argentina de Microbiología / Monica Prieto ; Lucia M. Cipolla ; Beatriz López ; compilación de Horacio Lopardo ; Silvia Predari ; Carlos Vay. - 1a ed. - Ciudad Autónoma de Buenos Aires : Asociación Argentina de Microbiología, 2021.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-987-48142-2-7

1. Microbiología. I. Cipolla, Lucia M. II. López, Beatriz. III. Lopardo, Horacio, comp. III. Predari, Silvia, comp. IV. Vay, Carlos, comp. V. Título.

CDD 616.9041



Capítulo Ite-2

Legionella

MÓNICA A. PRIETO

Jefa del Servicio Bacteriología Especial, Departamento de Bacteriología, INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”

Correspondencia. E-mail: pmaprieto@gmail.com

LUCÍA M. CIPOLLA

Bioquímica del Servicio Bacteriología Especial, Departamento de Bacteriología, INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”

Correspondencia. E-mail: lcipolla@anlis.gob.ar

BEATRIZ LÓPEZ

Jefa del Departamento de Bacteriología, INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”

Correspondencia. E-mail: bealopez@anlis.gob.ar

Indice

Capítulo	Título	Pág
Indice general		2
Ile.2	<i>Legionella</i>	
	Introducción	8
	Taxonomía	9
	Descripción del agente	12
	Ecología y Transmisión	16
	Patogénesis	20
	Características clínicas	24
	Epidemiología	31
	Diagnóstico microbiológico	38
	Muestras clínicas	39
	Examen microscópico	41
	Detección de antígeno urinario	42
	Cultivo e identificación	45
	Pruebas serológicas	48
	Detección de ácidos nucleicos	50
	Detección de <i>Legionella</i> spp. en aguas	57
	Subtipificación	59
	Sensibilidad a los antibióticos	65
	Prevención y control	67
	Bibliografía	70

Introducción

La enfermedad del legionario fue descrita en 1976 después de un importante brote de neumonía grave entre los asistentes a una convención de la Legión Americana en Filadelfia, Pensilvania. Fueron identificados 182 casos que resultaron en 29 muertes y la hospitalización de 147 personas ¹⁰¹. En 1977, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Atlanta, Estados Unidos, aisló el agente etiológico responsable del brote ¹⁸⁰ y en 1979 fue identificado como un bacilo gram negativo fastidioso que se clasificó dentro de un nuevo género y se denominó *Legionella pneumophila* ²⁹. La descripción del agente causal y el desarrollo de medios de cultivo para su crecimiento, permitieron el estudio retrospectivo de algunos brotes de la enfermedad respiratoria y el aislamiento ambiental de *Legionella*. La capacidad para aislar y cultivar estas bacterias condujo a la identificación de *Legionella* spp. en aislamientos humanos asociados a enfermedades respiratorias que habían sido considerados originalmente como debidos a especies de *Rickettsia* en las décadas de 1940 y 1960 ⁹³. Actualmente el término genérico "legionelosis" se utiliza para describir estas infecciones bacterianas, que pueden variar desde una enfermedad leve, febril, denominada Fiebre de Pontiac (FP) a una neumonía de rápida evolución y potencialmente mortal, denominada enfermedad del legionario (EL).

Taxonomía

La familia *Legionellaceae* está compuesta por un único género, *Legionella* y está filogenéticamente muy relacionada con la familia *Coxiellaceae*. *Coxiella burnetti*, el agente etiológico de la fiebre Q, comparte muchas características con *L. pneumophila*, incluyendo el parasitismo intracelular y varios genes asociados con la virulencia²²³.

Algunos investigadores propusieron clasificar la familia *Legionellaceae* en tres géneros: *Legionella*, *Fluoribacter* y *Tatlockia*^{31, 114}, en base a los bajos porcentajes de hibridación ADN-ADN entre algunas especies. Sin embargo, los análisis filogenéticos del gen que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal (16S *rRNA*) demostraron que se trata de una familia monofilética en la cual todas las especies estudiadas presentan similitudes mayores del 95%¹⁰³.

En la década de 1980, Selander *et al.* realizaron el primer estudio genético poblacional de *Legionella pneumophila*. Los investigadores observaron una heterogeneidad poblacional en la especie y propusieron subdividirla en 3 grupos: *L. pneumophila*, *Legionella* “especie 1” y *Legionella* “especie 2”²⁴³. Algunos años después, Brenner *et al.* clasificaron esos grupos como 3 subespecies: *L. pneumophila* subsp. *pneumophila*, *L. pneumophila* subsp. *fraseri* y *L. pneumophila* subsp. *pascullei*³⁰. Estas subespecies son indistinguibles bioquímicamente, pero pueden ser diferenciadas mediante la secuenciación del gen 16S *rRNA*.

Durante los últimos 10 años, los estudios genómicos poblacionales permitieron confirmar las observaciones realizadas por Selander y Brenner en la década de

1980 sobre la heterogeneidad de *L. pneumophila*^{84, 160, 222}. Estos análisis revelaron que todas las especies del género *Legionella* y, en particular, *L. pneumophila*, muestran mayores diferencias en su contenido genómico que las observadas en otros géneros y especies. Es importante tener en cuenta ese elevado grado de diversidad genética principalmente cuando se diseñan métodos moleculares para el diagnóstico de legionelosis.

Hasta el momento de la redacción de este capítulo, el género *Legionella* incluye 61 especies y 3 subespecies (<http://www.bacterio.net/legionella.html>). Desde el punto de vista clínico las especies más importantes son: *L. pneumophila*, *Legionella micdadei*, *Legionella longbeachae* y *Legionella dumofii*. Sin embargo, *L. pneumophila* es la especie involucrada en más del 90% de los casos de legionelosis. *Legionella anisa* es raramente asociada a infecciones, pero es la especie más frecuentemente aislada, junto a *L. pneumophila*, en sistemas de aguas del entorno hospitalario²⁶⁶. Otras especies fueron asociadas a legionelosis y a infecciones extrapulmonares y se detallan en la tabla 1. Estas especies infrecuentes podrían estar subdiagnosticadas debido a la falta de pruebas diagnósticas apropiadas¹⁸³.

Tabla 1. Especies del género *Legionella* distintas de *L. pneumophila* asociadas a infecciones humanas

	Tipos de infección	Referencias	Observaciones
<i>L. anisa</i>	Neumonía, artritis séptica, celulitis, endocarditis, osteomielitis	17, 237, 265, 266	Propuesta como indicador de contaminación con <i>Lp</i> en aguas.
<i>L. birminghamensis</i>	Neumonía	194, 277	LLPA
<i>L. bozemanæ</i>	Neumonía, artritis séptica, celulitis, endocarditis	9, 17, 183, 194	Casos de coinfección con <i>Lp</i>
<i>L. cardiaca</i>	Endocarditis	210	Infección en válvula nativa
<i>L. cincinnatiensis</i>	Neumonía, artritis séptica	17, 125, 260	
<i>L. dumoffii</i>	Neumonía, artritis séptica	9, 17, 21, 96, 183, 194	Casos de coinfección con <i>Lp</i>
<i>L. feeleii</i>	Neumonía	9, 21, 220, 274	Asociada a brote de FP en planta automotriz
<i>L. gormanii</i>	Neumonía	124, 194	
<i>L. hackeliae</i>	Neumonía	194	
<i>L. jordanis</i>	Endocarditis, neumonía	169, 271	La dependencia de la presencia de L-cisteína disminuye con los repiques sucesivos
<i>L. jamestowniensis</i>	Neumonía	83	
<i>L. lansingensis</i>	Neumonía	261	
<i>L. longbeachæ</i>	Neumonía, artritis séptica, celulitis, endocarditis	17, 168, 194, 219, 262	Prevalente en Australia. Brotes epidémicos relacionados a transmisión por compost.
<i>L. maceachernii</i>	Neumonía, PPB	47, 277	
<i>L. micdadei</i>	Neumonía, artritis séptica, celulitis, endocarditis	62, 113, 158, 183	Brotes epidémicos en pacientes trasplantados.
<i>L. nagasakiensis</i>	Neumonía	283	
<i>L. oakridgensis</i>	Neumonía	194	La dependencia de la presencia de L-cisteína disminuye con los subcultivos sucesivos.
<i>L. parisiensis</i>	Neumonía	170	
<i>L. rubrilucens</i>	Neumonía	9, 178	Coinfección con <i>Lp</i> .
<i>L. sainthelensi</i>	Neumonía	22, 171, 194	Brote en dos geriátricos (Canadá).
<i>L. steelei</i>	FP	81	
<i>L. tucsonensis</i>	Neumonía	2, 21, 194, 259	LLPA
<i>L. wadsworthii</i>	Neumonía	2, 80	LLPA

PPB: Piel y partes blandas; LLPA: *Legionella-like-amoebal pathogen*; FP: Fiebre de Pontiac; *Lp*: *L. pneumophila*

Descripción del agente

El género *Legionella* está constituido por bacilos gram negativos, no formadores de esporas, no encapsulados, que tienen hasta un 90% de ácidos grasos insaturados (ubiquinonas) en la pared celular, lo cual es inusual para una bacteria gram negativa. Presentan un tamaño de 0,3 a 0,9 micrones de diámetro y 1,5 a 5 micrones de longitud. Pueden presentar formas filamentosas (de 20 micrones o más) después del cultivo *in vitro*. La edad del cultivo también determina la morfología celular. Los cultivos frescos producen cocobacilos de 2-6 micrones de largo, mientras que las formas filamentosas se observan principalmente en cultivos envejecidos ^{79, 183}. Con la tinción de Gram, se pueden observar bacilos muy débilmente teñidos con safranina, por lo que se sugiere sustituir este colorante por fucsina al 0,1% para la tinción de estos microorganismos. Algunos aislamientos de *L. micdadei* pueden mostrar un carácter ácido-alcohol resistente en muestras de origen clínico; sin embargo, este carácter se pierde después del cultivo ³⁶.

Este género comprende bacterias aerobias estrictas con requerimientos nutricionales y un metabolismo no fermentativo. *Legionella* no desarrolla en los medios de cultivo utilizados para el aislamiento rutinario de patógenos respiratorios. Todas las especies requieren la presencia del aminoácido L-cisteína para el desarrollo *in vitro* y de hierro para estimular el crecimiento. Las especies *L. oakridgensis*, *L. jordanis* y *L. spiritensis* ocasionalmente pierden la dependencia de L-cisteína luego de sucesivos subcultivos *in vitro* ^{79, 204}.

El rango de temperatura de crecimiento es entre 20 °C y 42 °C. La temperatura óptima de crecimiento de todas las especies de importancia clínica es de 35 °C en ambiente húmedo y atmósfera con 2,5% de CO₂. El medio de cultivo sólido recomendado para el aislamiento de *Legionella*, tanto a partir de muestras clínicas como ambientales, es un medio agarificado de extracto de levadura tamponado que contiene carbón y es suplementado con L-cisteína e hierro (agar BCYE). La fuente de hierro puede ser nitrato férrico, sulfato férrico, cloruro férrico o pirofosfato férrico. El pH del medio es crítico para el desarrollo de *Legionella* y debe ser siempre ajustado a 6,9¹⁴⁶. El crecimiento *in vitro* de *L. pneumophila* es estimulado mediante el agregado de alfa-cetoglutarato (0,1%)⁷⁹ y el de las especies *L. micdadei* y *L. bozemanii* es estimulado al suplementar el medio BCYE con seroalbúmina bovina¹⁹⁵.

En medios sólidos, las colonias de *Legionella* suelen hacerse visibles después de 3 a 5 días de incubación. Las colonias jóvenes miden de 0,5 a 1,0 mm de diámetro, son planas, lisas, tienen una apariencia típica de vidrio esmerilado y un tono iridiscente. Las colonias más viejas aparecen opacas, con un centro blanco y con márgenes mal definidos³⁶ (Fig. 1).

Las especies de *Legionella* pueden producir un compuesto extracelular soluble en agua que muestra una fluorescencia amarilla-verde (*L. birminghamensis* y *L. wadsworthii*) al ser expuesto a la luz ultravioleta de longitud de onda de 366 nm. Algunas especies pueden producir autofluorescencia intracelular roja (*L. erythra*, *L. taurinensis* y *L. rubrilucens*) y blanca o azulada (*L. bozemaniae*, *L. cherrii*, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. parisiensis*, *L. steigerwaltii*, *L. tucsonensis* y la mayoría de las cepas de *L. anisa*)¹⁹⁴.

Las concentraciones de cloruro de sodio elevadas, la presencia de peróxidos tóxicos, lípidos y productos del metabolismo de otras bacterias y hongos, pueden inhibir el crecimiento de *Legionella* en medios sólidos ⁷⁹. El carbón activado del medio BCYE inactiva los peróxidos y lípidos tóxicos y el *buffer* orgánico reduce la concentración de cloruro de sodio. El agar BCYE es un medio complejo y se recomienda la utilización de formulaciones comerciales de laboratorios competentes. *Legionella* pueden sobrevivir en un amplio rango de condiciones ambientales. Las bacterias pueden tolerar la exposición a pH 2,0 por períodos cortos y fueron aisladas a partir de fuentes ambientales con pH de 2,7 a 8,3 ²⁴⁸. No sobreviven a temperaturas mayores de 60 °C. A temperaturas menores de 20 °C, *Legionella* detiene su multiplicación, pero permanece viable y, cuando la temperatura y los nutrientes alcanzan un nivel adecuado, comienza su multiplicación ¹⁸³. La mayoría de las especies son móviles por medio de la presencia de uno o más flagelos polares, pero la movilidad es a veces difícil de observar y su expresión es dependiente de factores ambientales ⁷⁹.

El lipopolisacárido (LPS) es uno de los componentes de la membrana externa más importantes y el principal antígeno inmunógeno de todas las especies de *Legionella*. La alta diversidad de moléculas de LPS proporciona la base para clasificar *L. pneumophila* en diferentes serogrupos y subgrupos utilizando anticuerpos monoclonales específicos (mAc) ^{135, 151}.

L. pneumophila es la especie más estudiada del género y se clasifica en al menos 16 serogrupos. *L. pneumophila* serogrupo 1 es el serogrupo prevalente en la infección humana y también puede ser clasificada en subgrupos de acuerdo a su reacción con un panel de mAc. Estos subgrupos son: Allentown/France,

Bellingham, Benidorm, Camperdown, Heysham, Knoxville, OLDA, Oxford y Philadelphia ^{133, 151}. El LPS de *L. pneumophila* serogrupo 1 contiene un epítipo asociado a la virulencia que depende de la expresión del gen *lag-1*, y que es reconocido por el mAc 2 o mAc 3/1 según los paneles de anticuerpos monoclonales internacionales utilizados ^{135, 159}. Varios estudios indican que entre el 65 y el 100% de los aislados clínicos de *L. pneumophila* serogrupo 1 reaccionan con mAc 3/1 mientras que solo el 15-35% de los aislados ambientales de *L. pneumophila* serogrupo 1 reaccionan con mAc 3/1 ^{75, 131, 134, 148, 159, 183}. Bernander *et al.* demostraron que todos los aislados reconocidos por mAc 3/1 portaban el gen *lag-1*, mientras que aquellos mAc 3/1 negativos no portaban el gen o el mismo contenía mutaciones e inserciones que afectaban su funcionalidad ²⁴.



Figura 1. Colonias de *L. pneumophila* en BCYE de 4 días de incubación (Foto: Servicio Bacteriología Especial, Departamento de Bacteriología, INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”)

Ecología y transmisión

El principal reservorio de *Legionella* spp. es el agua y los ambientes hídricos. Numerosos estudios ambientales demostraron la presencia de varias especies de *Legionella*, incluyendo las especies patógenas humanas, en ecosistemas acuáticos naturales y en fuentes artificiales de aguas templadas, como sistemas de plomería, calentadores, humidificadores, spas y torres de refrigeración ¹⁹³.

Legionella es ubicua en hábitats de agua dulce, incluidos ríos, lagos, arroyos, estanques, manantiales termales y aguas subterráneas y son naturalmente parte del microbioma de esos ecosistemas ¹⁸³. Varias especies también fueron recuperadas de abonos y mezclas para macetas en los Estados Unidos, Australia y el Reino Unido y en el suelo de tierras agrícolas tailandesas ^{36, 63, 183}.

En el ambiente, *Legionella* parasita amebas de vida libre y otros protozoos acuáticos ²⁶. Varios estudios demostraron que la patogenia y la ecología de *Legionella* están intrínsecamente relacionadas. En 1980, Rowbotham *et al.* revelaron por primera vez que *L. pneumophila* podía infectar amebas y lograron caracterizar el ciclo de vida de la bacteria en el protozoo ²³⁵. En 1983, Horwitz *et al.* demostraron que *L. pneumophila* evita la fusión fagosoma-lisosoma y se multiplica intracelularmente en macrófagos humanos ¹³⁸. Resultan sorprendentes las similitudes en los procesos por los cuales la bacteria infecta protozoos y células fagocíticas de mamíferos. Debido a la estrecha relación entre amebas y bacterias, su coevolución involucra constantes interacciones moleculares como el intercambio de material genético a través de la transferencia horizontal de genes.

Los genes que confieren una ventaja a las bacterias se fijan en sus genomas y permiten a estos patógenos subvertir las funciones del hospedador en su beneficio¹⁸⁸. Recientemente la secuenciación de los genomas de todas las especies del género *Legionella*, reveló que estas bacterias constituyen un modelo notable de adaptación bacteriana, con un genoma moldeado por su estrecha coevolución con amebas. Durante esta coevolución, la bacteria va cooptando genes y, por ende, funciones celulares de sus hospedadores eucariotas en un grado sorprendentemente alto, nunca antes observado para un organismo procariota. La adquisición y pérdida de estos genes de tipo eucariota es un proceso continuo que explica la naturaleza altamente dinámica de los genomas de *Legionella*^{118, 188}. Algunos investigadores describieron bacterias similares a *Legionella* que solo desarrollaban dentro de amebas de vida libre y fueron denominadas como LLAP (del inglés, *Legionella-like-amoebal pathogen*)²³⁴. Posteriormente, varios de los LLAP fueron designadas como especies nuevas del género *Legionella* y algunas de ellas fueron cultivadas exitosamente en cultivos axénicos^{2, 162, 163}.

La capacidad de *Legionella* de infectar y multiplicarse en amebas (principalmente *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Hartmannella* y *Tetrahymena*) la protege de la acción de biocidas⁷⁹. Las amebas infectadas con *Legionella* se encuentran a menudo en complejos consorcios de microorganismos dentro de biopelículas. Las bacterias pueden estar asociadas a amebas o en su forma libre. Están presentes en concentraciones muy bajas en agua corriente fría y en aguas tratadas con biocidas, pero pueden multiplicarse en agua tibia y especialmente estancada. Por lo tanto, las instalaciones hídricas de aguas templadas construidas por el hombre representan la principal fuente de infección de *Legionella*. Los dispositivos que

aerosolizan estas aguas contaminadas (torres de refrigeración, *spa*, duchas, fuentes decorativas) contribuyen a la diseminación de este microorganismo ¹³⁷.

Los brotes de legionelosis se deben principalmente a la capacidad de esta bacteria para colonizar y persistir en las instalaciones de agua a pesar de los drásticos tratamientos físicos y químicos. Cuando los tratamientos no son completamente eficientes, después de un período de tiempo, las bacterias pueden volver a colonizar rápidamente estos sistemas ¹³⁷. Recientemente fueron descritos en la literatura varios compuestos naturales (biotensioactivos, péptidos antimicrobianos) con propiedades anti-*Legionella* específicas ²³.

Fue documentada la presencia de *L. pneumophila* en aguas de sistemas pluviales luego de intensas lluvias ²⁴⁰. Algunos autores proponen que las precipitaciones pluviales deberían considerarse un factor de riesgo para la legionelosis adquirida en la comunidad ¹¹¹; sin embargo, aún no está claro su impacto en la salud pública.

La infección humana ocurre con mayor frecuencia como consecuencia de la inhalación de aerosoles generados por fuentes de agua contaminadas con *Legionella*, como duchas, *jacuzzis*, redes de plomería y sistemas de aire acondicionado que funcionan con torres de refrigeración ¹³⁷. Las unidades de aire acondicionado para el hogar y el automóvil no utilizan agua para enfriar el aire, por lo cual no representan un riesgo para el crecimiento de *Legionella*. Otra vía de transmisión, como la aspiración de agua contaminada, fue responsable de brotes relacionados con agua potable en los Estados Unidos ³⁴. Como los seres humanos son hospedadores accidentales para *Legionella*, la transmisión persona-persona

no es una vía comprobada. Sin embargo, en la literatura se documentó un único caso presuntivo de transmisión horizontal ¹⁸³.

Un grupo de investigadores analizó el microbioma de muestras de esputos de casos confirmados de neumonía por *L. pneumophila*, mediante secuenciación masiva de nueva generación. Este análisis reveló que *Legionella* no era el género dominante. El microbioma de las muestras de esputo, con abundancia relativamente baja de *Legionella*, estaba dominado principalmente por el género *Streptococcus*. Lo mismo se observó en las muestras de esputo correspondientes a casos de neumonía de la comunidad producida por otros patógenos. Sin embargo, la composición del microbioma de las muestras con una abundancia relativamente elevada de *Legionella*, estuvo dominada por géneros de origen acuático, tales como *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Helicobacter* y *Aeromonas*. Estos hallazgos sugirieron que las muestras con elevada abundancia de *Legionella* podrían corresponder a casos en los cuales la infección fue adquirida por inhalación de las amebas, con su microbioma propio ¹⁸⁶. A su vez, estudios en animales mostraron que ciertas especies de *Acanthamoeba*, como *A. castellanii* y *A. polyphaga*, pueden inducir un daño directo al parénquima pulmonar al causar neumonitis ¹⁷⁶. Por lo tanto, es posible que la inhalación de amebas infectadas con *Legionella* estén asociadas a cuadros más graves de EL.

La legionelosis es muy infrecuente en el período neonatal, no obstante, los partos acuáticos representan un riesgo potencial de exposición a *Legionella* para el recién nacido. El primer caso de neumonía por *L. pneumophila* en un neonato, adquirida por aspiración del agua contaminada de la piscina de parto, fue

documentado en el año 2001 ¹⁰⁰. Varios informes posteriores demostraron la asociación entre casos de legionelosis neonatal y partos en agua ^{19, 55, 102, 123, 244}. Factores como el llenado previo de la piscina días antes del parto, la desinfección inadecuada del tanque de parto, el uso de una fuente de agua contaminada y el calentamiento del agua, promueven el aumento de la carga de *Legionella*. Concentraciones bacterianas altas en el agua aumentan la posibilidad de que incluso los episodios de microaspiración puedan progresar a una neumonía grave en el neonato ¹⁹. Las recomendaciones del Reino Unido sobre partos en el agua enfatizan que las piscinas con bombas de recirculación no deben utilizarse y que los tanques deben desinfectarse adecuada e idealmente llenarse solo en el momento del parto y no con anterioridad ⁵⁵. El Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos estableció que los datos acerca de riesgos y beneficios del parto en agua son insuficientes y recomiendan evitar dicha práctica ⁵⁸.

Patogénesis

L. pneumophila es un patógeno intracelular facultativo y su patogénesis está directamente relacionada con su capacidad de invadir y multiplicarse en un gran número de células eucariotas, incluidos fagocitos mononucleares, fundamentalmente monocitos, macrófagos alveolares humanos y también diversas células epiteliales y fibroblastos ⁹⁴. Los nichos ambientales e intracelulares de *Legionella* exponen a las bacterias a una variedad de disponibilidad de nutrientes y condiciones de temperatura por lo que requieren ser altamente adaptables. Al

igual que otros patógenos intracelulares, *L. pneumophila* tiene un ciclo de crecimiento bifásico. Una fase replicativa (avirulenta) y una fase transmisiva (virulenta) ³⁸. Estos cambios ocurren durante la transición entre ambientes intracelulares y extracelulares y se acompañan de cambios específicos en el patrón de expresión génica. Cuando las condiciones ambientales son favorables para su replicación (ambientes ricos en nutrientes) *L. pneumophila* reprime la expresión de genes involucrados en procesos que favorecen la transmisión (movilidad, resistencia a los ácidos, citotoxicidad) y expresa genes necesarios para la multiplicación intracelular. En cambio, cuando los nutrientes son escasos y la densidad bacteriana disminuye, la bacteria detiene su multiplicación y comienza a expresar los genes necesarios para la transmisión ¹⁸⁸. Como consecuencia de este ciclo de vida bifásico, la infección de una célula hospedadora y la supervivencia de *L. pneumophila* dentro de la misma dependen de su estado metabólico.

La bacteria causa enfermedad en humanos principalmente al infectar los macrófagos alveolares después de la inhalación de aerosoles de agua contaminada. Las bacterias fagocitadas pueden eludir la degradación lisosómica y subvertir las vías metabólicas de la célula hospedadora para permitir su replicación en un sofisticado compartimiento intracelular conocido como vacuola de contención de *Legionella* (VCL) ²⁰⁰. Este compartimiento donde se replica la bacteria es morfológicamente indistinguible del que se encuentra durante el crecimiento dentro de las amebas ¹⁴¹. La patogenia molecular y celular de *L. pneumophila* se ha estudiado en detalle, pero el mecanismo patogénico de las

otras especies es desconocido, a excepción de *L. longbeachae*, que ha sido objeto de algunos estudios ^{168, 214}.

Muchos patógenos bacterianos utilizan sistemas especializados de secreción para translocar proteínas efectoras de virulencia u otros factores hacia la célula hospedadora. Estas proteínas efectoras interfieren con la respuesta antimicrobiana del hospedador y facilitan la supervivencia del patógeno ¹⁰⁷.

Legionella emplea diferentes sistemas de secreción para el transporte de proteínas y otras moléculas asociadas a la virulencia. Los sistemas de secreción tipo 2 (T2SS) y tipo 4 (T4SS) están presentes en todas las especies de *Legionella*; sin embargo, el sistema de secreción tipo 1 (T1SS) está restringido a *L. pneumophila* ¹¹⁸. El T4SS se subdivide en tipo IVA, codificado por la región *lvh* (del inglés, *L. pneumophila virulence homologues*) y tipo IVB, codificado por el operón *dot/lcm*. La región *lvh* contiene 11 genes que codifican el sistema TSS4A y es un elemento genético móvil que puede estar integrado en el cromosoma o como plásmido en múltiples copias ⁴³. La región *lvh* se distribuye al azar entre diferentes especies del género *Legionella* y participa en el proceso de infección de la célula hospedadora ^{118, 188}. El sistema T4SS (*dot/lcm*) es un factor de virulencia esencial ya que gobierna todos los procesos de la vida intracelular de *L. pneumophila* a través de la secreción de más de 330 proteínas efectoras involucradas en procesos celulares conservados entre protozoos y mamíferos ^{188, 286}. Este sistema de secreción también se encuentra en *Coxiella burnetii*, el agente etiológico de la fiebre Q ^{37, 39}. *L. pneumophila* posee muchos de los factores de patogenicidad tradicionales de las bacterias, como el LPS, flagelos, *pili* y algunas proteínas de la membrana externa, como las vesículas de membrana externa (OMV), la

fosfolipasa A, la fosfolipasa mayor secretada, el Mip (potenciador de la infectividad en macrófagos) y la proteína Hsp60 ²⁸⁵. El gen *mip* fue descrito como el primer gen asociado a la virulencia y es necesario para una infección eficaz de la célula hospedadora ⁹⁴. Por ello es el blanco genético más ampliamente utilizado en los métodos basados en PCR para el diagnóstico de legionelosis.

Legionella es una bacteria exigente y la adquisición de hierro es indispensable para el crecimiento intra y extracelular. Por lo tanto, algunos factores relacionados con la absorción o adquisición de hierro son críticos para la virulencia ^{6, 167}. La proteína formadora de poros RtxA está involucrada en los procesos de adhesión y citotoxicidad y es un factor de virulencia esencial para producir enfermedad ^{50, 65}. Actualmente, los datos disponibles a partir de los estudios genómicos poblacionales, avalan la hipótesis que solo algunos pocos clones de *L. pneumophila* son capaces de producir legionelosis ^{67, 119}. Estos clones poseen los loci *lvh* y *rtxA*; por lo tanto, estos genes representan interesantes blancos genéticos para la detección de cepas potencialmente más virulentas en estudios ambientales ¹⁶¹. Numerosos factores de virulencia que participan en el ciclo de infección de *L. pneumophila* están codificados por distintas regiones de ADN, denominadas islas de patogenicidad (IP), presentes en el genoma de bacterias patógenas y ausentes en cepas no patógenas. Muchos de estos factores han sido bien caracterizados y hay numerosas revisiones disponibles sobre el tema ^{155,184,}

188, 200, 201, 285 .

Características clínicas

El término "legionelosis" abarca todas las formas de enfermedades humanas causadas por *Legionella* spp. y se asocia con tres entidades clínicas y epidemiológicamente distintas: la enfermedad del legionario (EL), la fiebre de Pontiac (FP) y la legionelosis extrapulmonar (LEP). La forma más común es la EL, una neumonía aguda grave, que ocurre esporádicamente o como epidemias, y requiere hospitalización. En el 65-90% de los casos, es atribuible a la infección por la especie *L. pneumophila*¹⁸². Por el contrario, la FP es una enfermedad con sintomatología pseudogripal, leve y autolimitada que es producida por una respuesta inflamatoria a una endotoxina bacteriana¹⁵⁰. Los síntomas de la FP son inespecíficos, por lo cual la incidencia real se desconoce.

La neumonía por *Legionella* presenta tasas de mortalidad que pueden ser tan elevadas como 40-80% en pacientes inmunodeprimidos no tratados y puede reducirse a 5-30% mediante el manejo apropiado de casos y dependiendo de la gravedad de los signos y síntomas clínicos. En general, la tasa de mortalidad suele oscilar entre el 5 y el 10%²⁸¹ con un promedio del 12%^{79, 136}.

La LEP es muy infrecuente y ocurre principalmente en individuos inmunodeprimidos. Puede manifestarse como endocarditis, miocarditis, afectación neurológica y falla multiorgánica. También fueron descritos varios tipos de lesiones cutáneas, como erupción maculopapular, erupción petequiral, eritema con ampolla focal, celulitis, pústulas, abscesos y masas subcutáneas^{48, 104, 127, 140, 142, 150, 205}. En adultos, la infección extrapulmonar más frecuente es la cardíaca³⁵. En niños, la

infección puede afectar varios órganos (hígado, bazo, cerebro, nódulos linfáticos) y las manifestaciones clínicas pueden incluir sinusitis, celulitis, peritonitis, pielonefritis, pancreatitis, infección de herida, miocarditis y pericarditis ⁹⁸.

En un trabajo reciente, en el cual se desarrollaron algoritmos para mejorar el diagnóstico de las endocarditis con cultivo negativo (ECN), Fournier *et al.* incluyeron *Legionella* en el diagnóstico diferencial de los patógenos clásicos de las ECN, como *Bartonella*, *Brucella*, *Mycoplasma pneumoniae* y *C. burnettii*. Los autores consideraron que títulos de anticuerpos totales anti-*Legionella* mayores de 1/256 representan una alta sospecha de *Legionella* sp. como agente etiológico de la ECN ⁹⁷.

Legionella, junto a *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae*, representan el grupo atípico de patógenos respiratorios bacterianos no zoonóticos, responsable del 22% de los casos de neumonías de la comunidad en Estados Unidos y Canadá y hasta un 28% de casos en todo el mundo ¹⁸³. Los factores de riesgo asociados con la infección grave por *Legionella* se detallan en la tabla 2.

Los pacientes trasplantados son un grupo de riesgo muy importante en brotes de legionelosis nosocomial. Una revisión retrospectiva de 32 casos de infecciones por *Legionella* spp. ocurridas en un período de 15 años en un centro de salud en Seattle demostró que el 68,8% de los casos de legionelosis ocurrieron en pacientes trasplantados. Once (50%) casos fueron causados por *L. pneumophila* y siete (31,8%) por *L. micdadei*. Dos pacientes presentaron manifestaciones extrapulmonares, un cuadro de sepsis por *L. pneumophila* y un caso de celulitis fatal por *L. micdadei* ²⁵¹.

Los viajes son un factor de riesgo importante asociado con la legionelosis y, a menudo, es subestimado en el entorno comunitario. Viajar y permanecer fuera del hogar, particularmente en alojamientos con sistemas de agua mal mantenidos, es un factor de riesgo reconocido para la EL. Los alojamientos públicos como hoteles, complejos turísticos y cruceros a menudo tienen torres de enfriamiento, *jacuzzis*, fuentes decorativas, duchas y otros dispositivos que pueden aerosolizar agua y transmitir *Legionella* a los ocupantes si no se realiza el mantenimiento adecuado de las cañerías y la calidad del agua ¹⁸. Entre los brotes investigados por el CDC entre los años 2000-2014 asociados a los sistemas de agua de edificios, casi el 90% fueron causados por problemas absolutamente prevenibles con un programa eficaz de gestión del agua ¹¹³.

Tabla 2. Factores de riesgo asociados a infecciones graves por *Legionella* spp.

Factor	Observaciones ^{82, 139, 150, 251, 263, 281}
Edad	El riesgo aumenta a partir de los 50 años
Sexo	De los casos informados, el 60–70% fueron del sexo masculino
Tabaquismo	Aumenta el riesgo de 2 a 7 veces
Enfermedades crónicas	Enfermedad pulmonar crónica, insuficiencia renal, diabetes
Trasplante de órgano sólido	Aumento del riesgo asociado al uso de prednisona, ciclosporina A y a episodios de rechazo.
Comorbilidades	Cáncer de pulmón, neoplasias hematológicas (leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica)
Terapia inmunosupresora	En pacientes inmunosuprimidos, pueden ocurrir complicaciones como el derrame pleural y la cavitación aún con una terapia antibiótica adecuada. En esta población la neumonía por <i>Legionella</i> tiende a progresar a la formación de abscesos, lo que no es frecuente en otros pacientes.

La EL no se puede distinguir fácilmente de otras formas de neumonía adquirida en la comunidad a partir de características clínicas, radiológicas o estudios de laboratorio inespecíficos ⁷⁹. El período de incubación generalmente es de 2-14 días, con un promedio de 5-6 días. El inicio de la neumonía es leve, similar al de episodios neumónicos causados por otros microorganismos. A menudo no hay signos de afección respiratoria en las etapas tempranas de la enfermedad, momento en que solo se observan síntomas que incluyen fiebre, rigores y mialgias. Durante el transcurso de la enfermedad aparece una tos no productiva, que sigue por un periodo de 4 a 6 días más y que cursa con pequeñas cantidades de esputo purulento, situación que puede intensificarse si la enfermedad progresa rápidamente. Las imágenes radiográficas muestran zonas irregulares o focales de consolidación, que pueden evolucionar a la afectación bilateral y a la insuficiencia respiratoria ^{82, 136}. Pueden aparecer hallazgos inespecíficos de laboratorio como hiponatremia, altos niveles de creatina quinasa, leucocitosis con linfopenia, ferritina elevada a más del doble y microhematuria ⁶². Algunas veces pueden aparecer síntomas no respiratorios como náuseas, vómitos, diarrea y delirio ²⁵⁴. También se han informado múltiples síntomas gastrointestinales por *Legionella*, que incluyen náuseas, vómitos, transaminasas elevadas, diarrea secretora (20 a 40%), peritonitis e incluso hemorragia secundaria a úlceras por estrés ²¹⁸. La presencia de manifestaciones gastrointestinales y neurológicas en pacientes inmunodeprimidos con neumonía, debería alertar al médico sobre la EL ⁶². La recuperación del paciente puede ser lenta y mostrar secuelas como fatiga, síntomas neurológicos, neuromusculares y desorden de estrés postraumático ^{108, 165}. La gravedad de la neumonía en la presentación del cuadro, las enfermedades

subyacentes y la prontitud de la terapia con antibióticos específicos son factores importantes en el pronóstico del paciente.

Legionella es un patógeno intracelular, por lo tanto, los antibióticos contra la EL deben acumularse y ser bioactivos dentro de estas células. Los β -lactámicos y los aminoglucósidos son ineficaces. Todas las especies del género son sensibles a los macrólidos y fluoroquinolonas ¹⁸³. Las terapias preferidas para pacientes inmunodeprimidos con EL incluyen levofloxacina y azitromicina ⁸². Existen pocos estudios clínicos que comparen la utilización de levofloxacina y azitromicina para el tratamiento de EL. Recientemente, en un estudio retrospectivo, un grupo de investigadores analizó una cohorte de pacientes adultos hospitalizados por EL y encontró resultados similares de mortalidad, duración de la estancia hospitalaria y desarrollo de colitis por *Clostridioides difficile* en los pacientes tratados con levofloxacina y con azitromicina ¹¹². En 2019, Arget *et al.* describieron un caso de EL en un paciente inmunodeprimido y gravemente enfermo, alérgico a fluoroquinolonas y macrólidos. Los autores documentaron que el paciente fue tratado exitosamente con tigeciclina y propusieron la droga como una alternativa terapéutica de segunda línea, segura y eficaz, para el tratamiento de EL en casos particulares ¹².

En 2002, Tan *et al.* describieron seis casos de EL confirmados por la presencia de antígeno urinario y/o seroconversión, los cuales presentaron bacteriemia por otros patógenos como *Streptococcus pneumoniae* (n=4), *Streptococcus pyogenes* (n=1) y *Enterobacter cloacae* (n=1). Debido a estos hallazgos, los investigadores recomendaron que la terapia antibiótica empírica para pacientes que viven en áreas de endemicidad y son fumadores debería siempre incluir drogas activas

contra *Legionella* ²⁵⁶. También fueron documentados casos de coinfección de *Legionella* con *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Pneumocystis jirovecii*, *Aspergillus fumigatus* y virus influenza ^{164, 186, 196, 232, 236}. Recientemente fue descrita la coinfección con SARS-Cov-2 en un caso de EL ¹¹.

Los patógenos aún se consideran como entidades únicas y uniformes, a pesar de la creciente evidencia que demuestra que las infecciones, con frecuencia, involucran a más de una especie del patógeno o múltiples cepas de la misma especie ¹⁶. Las investigaciones sobre las consecuencias de las infecciones por múltiples cepas de un género o una especie y el impacto en la evolución del patógeno y la dinámica de la enfermedad, aún son limitadas debido a los desafíos técnicos para distinguir eficazmente cepas individuales de muchos patógenos ¹²⁸. Las pruebas diagnósticas como el antígeno urinario, no permiten identificar infecciones por múltiples cepas de *Legionella*. Es indispensable realizar cultivo y pocos laboratorios lo realizan, por lo tanto, la coinfección con diferentes cepas de *Legionella* es probable que esté subestimada. Durante el período 2002-2012, los laboratorios de referencia de Austria, Dinamarca, Reino Unido y Alemania, documentaron 5 casos de coinfecciones por distintas especies de *Legionella* [*L. pneumophila* y *L. bonzemanii* (n=3), *L. pneumophila* y *L. dumoffii* (n=1), *L. pneumophila* y *L. longbecheae* (n=1)] y 10 casos de infección por distintos serogrupos y genotipos de *L. pneumophila* ²⁷⁵. Otro ejemplo lo constituye un brote ocurrido en 2008 en la comunidad de Valencia, España, en el cual Coscollá *et al.* analizaron los perfiles de subtipificación basados en secuencias (SBT) de 3 muestras de esputo de distintos pacientes por secuenciación directa a partir de las

muestras. De las mismas no se recuperó *Legionella* por cultivo, pero se evidenció la presencia de más de un genotipo de *L. pneumophila* en cada caso. Estos hallazgos sugirieron que los pacientes podrían haberse infectado del medio ambiente con más de una cepa de *L. pneumophila* o haber sufrido múltiples infecciones por un período corto de tiempo. Esto evidencia lo compleja que puede ser una infección por *Legionella* y la necesidad de considerar el comportamiento epidemiológico de este microorganismo al momento de analizar los resultados de estudios moleculares realizados durante la investigación de brotes de legionelosis⁶⁰.

Los estudios sobre la composición del microbioma pulmonar son muy recientes y se han enfocado principalmente en pacientes con fibrosis quística, asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica⁴². Sin embargo, la composición del mismo durante enfermedades infecciosas como la neumonía, es aún, un terreno bastante inexplorado. En el año 2020, un grupo de investigadores analizó la composición y evolución del microbioma pulmonar en muestras de lavado bronquioalveolar de pacientes con infecciones persistentes causadas por *L. pneumophila*²¹². Su composición se caracterizó por un fuerte predominio de este patógeno, una baja diversidad de la fracción bacteriana y una mayor presencia de microorganismos oportunistas en comparación con el microbioma pulmonar de individuos sanos. Durante el tratamiento prolongado con antibióticos no se detectaron cambios genómicos o mutaciones asociados a resistencia antimicrobiana en el genoma de *L. pneumophila* que pudieran explicar la persistencia de la infección. Sin embargo, después del tratamiento antibiótico, observaron que el microbioma estaba constituido principalmente por especies

bacterianas resistentes y enriquecido en bacterias, arqueas, hongos o protozoos asociados con patogenicidad. Por lo tanto, es posible que el microbioma pulmonar alterado durante la infección y después del tratamiento antibiótico prolongado, podría contribuir a una respuesta más lenta a la cura de la enfermedad, ya que ciertas especies oportunistas pueden aumentar su patogenicidad en el contexto de las respuestas inflamatorias del hospedador inducidas por la infección ⁷¹.

Epidemiología

La legionelosis puede afectar tanto a individuos en la comunidad como en el ambiente nosocomial y, en ambos entornos, puede ocurrir en forma de casos esporádicos o brotes epidémicos ³⁶.

La definición epidemiológica de caso utilizada por el CDC para la vigilancia de la legionelosis fue modificada en el año 2020 e incluye criterios clínicos, de laboratorio y epidemiológicos. Para la EL, el criterio clínico principal es la presentación de una neumonía diagnosticada clínica y/o radiológicamente. La FP puede presentar síntomas más leves, similares a los de la EL, pero sin neumonía. Como se ha descrito, La LEP puede causar enfermedad en distintos sitios anatómicos y su diagnóstico depende de la presencia de *Legionella* en dichos sitios. Los criterios de laboratorio, se clasifican como evidencia confirmatoria o presuntiva y se detallan en la tabla 3. Los criterios epidemiológicos incluyen el vínculo del caso con una fuente confirmada para presencia de *Legionella* (por ejemplo, un muestreo ambiental positivo asociado con un crucero, alojamiento

público, torre de enfriamiento, etc.) o el vínculo con un entorno en el que se sospecha la presencia de una fuente potencial de *Legionella* y se asocia con, al menos, un caso confirmado (por ejemplo, hospitales, hogares, hoteles, etc.).

Tabla 3. Criterios de laboratorio para la definición de caso de legionelosis

Evidencia	Determinaciones
Confirmatoria	<p>Método estándar de oro: aislamiento de <i>Legionella</i> spp. de secreciones respiratorias bajas, tejido pulmonar, líquido pleural o sitio extrapulmonar.</p> <p style="text-align: center;">o</p> <p>Detección de ácidos nucleicos de <i>Legionella</i> spp. de secreciones respiratorias bajas, tejido pulmonar, líquido pleural o sitio extrapulmonar, por PCR validada.</p> <p style="text-align: center;">o</p> <p>Detección de antígeno urinario de <i>Lp1</i> en orina utilizando reactivos validados.</p> <p style="text-align: center;">o</p> <p>Cuadruplicación del título de anticuerpos totales anti-<i>Lp1</i> en muestras pareadas de la fase aguda y convaleciente utilizando reactivos validados.</p>
Presuntiva	<p>Cuadruplicación del título de anticuerpos totales contra <i>Lp</i> de otros serogrupos distintos al serogrupo 1</p> <p style="text-align: center;">o</p> <p>Cuadruplicación del título de anticuerpos totales contra otras especies de <i>Legionella</i></p> <p style="text-align: center;">o</p> <p>Detección de antígenos específicos de <i>Legionella</i> en secreciones respiratorias bajas o tejidos por inmunofluorescencia directa utilizando reactivos validados.</p>

PCR: reacción en cadena de la polimerasa; *Lp*: *Legionella pneumophila*

La definición de casos, de acuerdo a los tres criterios descritos por el CDC, se detallan en la tabla 4. La Unión Europea no considera la detección de ADN de

Legionella spp. en muestras clínicas mediante PCR como un criterio de laboratorio confirmatorio, sin embargo, lo incluye como un criterio de laboratorio presuntivo ⁵⁷.

Tabla 4. Clasificación de caso, según los CDC, Atlanta, EE.UU.

(<https://www.cdc.gov/nndss/conditions/legionellosis/case-definition/2020/>)

Enfermedad	Caso	Criterios
Enfermedad del Legionario (EL)	Confirmado	Caso clínicamente compatible con EL con evidencia de laboratorio confirmatoria.
	Sospechoso	Caso clínicamente compatible con EL con evidencia de laboratorio presuntiva.
	Probable	Caso clínicamente compatible con EL que cumple con el criterio epidemiológico 14 días antes del inicio de los síntomas.
Legionelosis extrapulmonar (LEP)	Confirmado	Caso clínicamente compatible con evidencia de laboratorio confirmatoria.
	Sospechoso	Caso clínicamente compatible con EL con evidencia de laboratorio presuntiva.
Fiebre de Pontiac (FP)	Confirmado	Caso clínicamente compatible con EL con evidencia de laboratorio confirmatoria.
	Sospechoso	Caso clínicamente compatible con EL con evidencia de laboratorio presuntiva.
	Probable	Caso clínicamente compatible que cumple con criterio epidemiológico tres días antes del inicio de los síntomas

La legionelosis sigue un patrón estacional que difiere del de otras formas de neumonía, pero refleja el de muchas enfermedades transmitidas por el agua, con una incidencia máxima en el verano ^{215, 221}. Aún no hay suficientes datos para establecer vínculos entre factores demográficos o socioeconómicos y legionelosis.

No obstante, varios organismos de salud pública de los Estados Unidos han demostrado una mayor incidencia de legionelosis en las personas afroamericanas^{77, 154}. Un estudio realizado en los Estados Unidos, que evaluó la incidencia y los factores de riesgo de legionelosis en el estado de Nueva York durante el período 2002-2011, demostró la asociación entre factores socioeconómicos y una mayor incidencia de la enfermedad. Los datos recopilados mostraron un gradiente distinto en la incidencia de acuerdo con la pobreza a nivel de vecindario, que iba desde 3,0 casos promedio anuales por 100 000 habitantes en las áreas de mayor pobreza a 1,2 casos promedio anuales por 100 000 habitantes en las áreas de menor pobreza. Este análisis también reveló que la incidencia de legionelosis varió según los grupos étnicos, con la mayor incidencia entre los afroamericanos⁹².

La incidencia exacta de la legionelosis en el mundo es desconocida, principalmente porque los países difieren en la robustez de sus sistemas de vigilancia, los métodos de diagnóstico utilizados y el nivel de notificación. En Europa, Estados Unidos y Australia, se notifican anualmente entre 10 y 15 casos por millón de habitantes²⁸¹. *L. pneumophila* serogrupo 1 es responsable del 65-90% de los casos de legionelosis en el mundo^{82, 281}. Sin embargo, Nueva Zelanda y Australia presentan un patrón epidemiológico distinto, en el cual la prevalencia de *L. longbecheae* y *L. pneumophila* son similares¹²². Mientras que las infecciones por *L. pneumophila* están asociadas al agua contaminada, la legionelosis por *L. longbecheae* está relacionada a la exposición a tierra y compost contaminado. La comparación del genoma de *L. longbecheae* y *L. pneumophila* mostró muchas diferencias específicas de especie que podrían explicar las

características epidemiológicas y los distintos nichos ecológicos que ocupan ambas especies ¹⁵⁵.

En Estados Unidos, los casos de legionelosis notificados se cuadruplicaron desde el año 2000. No está claro si este aumento se debe a un mejor diagnóstico por parte de los laboratorios, una mayor susceptibilidad de la población, una mayor presencia de *L. pneumophila* en el medio ambiente o una combinación de todos los factores ^{92, 183, 284}. La tasa de incidencia nacional en ese país aumentó de 0,42 por 100 000 personas en 2000 a 2,29 por 100 000 personas en 2017 ⁴⁴. Según el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC), la tasa de incidencia de legionelosis en Europa en 2017 fue de 18 casos por millón de habitantes ⁸⁷. Durante el período 2015-2017, el 70,7% de los casos fueron adquiridos en la comunidad, el 22% asociados a viajes y el 7,3% asociados a cuidados de la salud ^{4, 268}. Durante ese período, 9 de los 30 países que informaron al ECDC notificaron 28 brotes de legionelosis, ya sea en la comunidad o en el hospital ⁸⁷. La tasa de mortalidad osciló entre 0,07 y 0,09 muertes por 100 000 individuos, con un marcado descenso durante los últimos años, probablemente debido al avance de la tecnología diagnóstica ¹⁸⁸.

La mayoría de los casos de EL son esporádicos, sin embargo, cuando ocurren brotes en la comunidad, estos tienen un impacto sustancial en la salud pública. En 2001, el mayor brote de legionelosis documentado hasta el momento, con más de 800 casos sospechosos y 449 confirmados, ocurrió en Murcia, España. La mortalidad fue del 1%. La fuente de infección fue la torre de enfriamiento del hospital de la ciudad ¹¹⁰. En Francia, a fines del año 2003 y principios de 2004, ocurrió el brote de legionelosis con mayor tasa de mortalidad descrito en ese país.

Ochenta y seis casos fueron confirmados y la tasa de mortalidad fue del 21%. La fuente de infección fueron las torres de enfriamiento de una planta petroquímica²⁰². En 1989, Addiss *et al.* sugirieron que los aerosoles de agua contaminada con *Legionella* spp. podrían alcanzar una distancia de transmisión aérea de al menos 3,2 km de la zona contaminada¹. Sin embargo, la investigación epidemiológica del brote de Francia del año 2003, reveló que el área de exposición a los aerosoles contaminantes alcanzó un radio de 12 km desde las torres de enfriamiento, un área de dispersión mucho mayor de lo descrito hasta ese momento²⁰². En 2014 ocurrió un brote en una ciudad industrial en Portugal que afectó a 403 personas, de las cuales 377 fueron casos confirmados y 14 muertos. La fuente de infección identificada fue una torre de enfriamiento industrial¹¹⁵. En 2015, se produjeron dos brotes de EL en el distrito del Bronx en la ciudad de Nueva York, uno de los cuales fue el más grande jamás registrado en esa ciudad y el segundo brote comunitario más grande en la historia de Estados Unidos, con 128 casos y 12 muertes. Ambos brotes se relacionaron con torres de enfriamiento mediante el uso de métodos moleculares con aislados clínicos y ambientales. Esto motivó la promulgación de una legislación integral para regular e inspeccionar las torres de enfriamiento para la prevención de brotes de legionelosis⁹⁵. En 2019, ocurrió un brote de EL entre los asistentes a un evento en la ciudad de Carolina del Norte, Estados Unidos, con 136 hospitalizados y 4 muertes. La fuente probable de infección fueron *jacuzzis* que formaban parte de la exposición¹⁹⁸. A finales del año 2020, un brote en Portugal afectó a 79 personas y ocurrieron 14 óbitos. Al momento de escribir este capítulo, las investigaciones epidemiológicas no habían finalizado y la fuente aún no había sido detectada⁸⁶. Este brote ocurrió durante la pandemia de COVID-19

que el mundo aún está atravesando. Las medidas de prevención y confinamiento para la contención de la pandemia, representan un riesgo potencial para la proliferación de *Legionella* en sistemas de agua que no hubieran sido controlados y/o mantenidos durante los cambios en las actividades de las instalaciones turísticas e industriales ⁷⁰. Debido a que la EL presenta síntomas similares en el mismo grupo de riesgo que COVID-19, el ECDC recomendó a sus miembros reforzar los sistemas de alerta para la detección temprana de brotes de legionelosis ^{86, 89}.

En Latinoamérica, la información sobre legionelosis es escasa. En un estudio prospectivo multicéntrico realizado durante 18 meses en 2005-2006 en la ciudad de Santiago, Chile, en el cual se incluyeron casos de neumonía grave de la comunidad, la incidencia de *L. pneumophila* fue del 8,6% y ocupó el segundo lugar como agente etiológico, detrás de *S. pneumoniae* ¹⁰. En el año 2010, México confirmó el primer brote de legionelosis en una instalación turística en la isla de Cozumel. Nueve turistas presentaron cuadros de legionelosis durante sus estancias de dos semanas en instalaciones hoteleras. Todos los casos fueron confirmados por laboratorio. El sistema de agua potable de las instalaciones fue la única fuente común de exposición. Durante el estudio se recuperó *L. pneumophila* en cultivo en el 87% de las muestras de agua analizadas. Los estudios de subtipificación molecular permitieron demostrar la presencia del mismo secuenciotipo en una muestra clínica y en numerosas muestras de agua ¹³⁰. En un estudio prospectivo sobre neumonías de la comunidad llevado a cabo en un Hospital Universitario en Brasil, durante un periodo de 12 meses, los investigadores informaron una incidencia de 5,1% de neumonía por *L. pneumophila* ⁴⁶.

En la Argentina, el primer estudio de neumonías de la comunidad en el cual se investigaron casos de legionelosis, fue realizado en un Hospital Universitario durante un período de 12 meses (1997-1998) y se informó una incidencia de *L. pneumophila* de 3,5% ¹⁷⁴. Durante el período 2015-2017, el Laboratorio Nacional de Referencia para Legionelosis en Argentina, recibió 107 muestras clínicas de 64 pacientes derivadas con diagnóstico de neumonía atípica de la comunidad. El 20% de los casos fueron confirmados como legionelosis producida por *L. pneumophila* serogrupo 1 ³.

Diagnóstico microbiológico

Las características clínicas de la infección por *Legionella* pueden ser indistinguibles de las de otros agentes patógenos de neumonía adquirida en la comunidad y nosocomial, por lo tanto, los métodos de diagnóstico precisos son esenciales para proporcionar una terapia dirigida y oportuna. Para instaurar un tratamiento antibiótico adecuado es suficiente confirmar la infección por *Legionella* sp. Sin embargo, la identificación de especie, serogrupo y subtipo es indispensable cuando ocurren aglomerados de casos y se investiga la exposición a una fuente común. No existe ninguna prueba disponible actualmente que permita la detección de todas las especies de *Legionella* asociadas a infecciones humanas con un alto grado de sensibilidad y especificidad; por lo tanto, se recomienda el examen de diferentes tipos de muestras con varias pruebas en paralelo. Es importante considerar legionelosis en el diagnóstico diferencial de

cuadros de neumonías graves, principalmente en los pacientes ingresados a unidades de cuidados intensivos, aquellos con una neumonía que no responde a la terapia con antibióticos β -lactámicos y pacientes con factores de riesgo específicos, por ejemplo, viajes recientes: dentro de los 10 días posteriores al inicio de los síntomas, ciertas ocupaciones en las que puede haber ocurrido exposición a *Legionella*, reparación reciente de sistemas de plomería, inmunosupresión y enfermedad subyacente grave.

Muestras clínicas

Los especímenes clínicos de rutina para el diagnóstico de legionelosis incluyen secreciones del tracto respiratorio inferior (STRI) para cultivo y para reacción en cadena de la polimerasa (PCR), orina para detección de antígeno urinario y sueros pareados, correspondientes a la fase aguda y de convalecencia, para pruebas serológicas. En la tabla 5 se detallan las características de los distintos métodos diagnósticos de laboratorio. Para el cultivo de *Legionella* spp., deben procesarse principalmente las STRI, recogidas por los métodos usuales (esputo, lavado broncoalveolar, aspirado bronquial, aspirado traqueal) y, menos frecuentemente, sangre, líquido pleural y biopsia de pulmón. La biopsia de pulmón presenta el mayor índice de recuperación por cultivo de *L. pneumophila*, seguido por las STRI⁷⁹. El líquido pleural presenta muy baja recuperación, pero debería ser cultivado si la muestra está disponible. Los especímenes para cultivo deben ser recolectados durante la fase aguda de la enfermedad y preferentemente antes del inicio de la terapia con antibióticos. *Legionella* puede sobrevivir hasta una semana en

especímenes clínicos ¹⁸³. Las STRI y las biopsias de pulmón deben ser recogidas en contenedores estériles y enviadas al laboratorio a temperatura ambiente en forma urgente. Si el envío se retrasa por varias horas, los materiales deben ser almacenados y transportados a temperaturas de 2 °C a 5 °C. El mantenimiento de las muestras por períodos más prolongados debe realizarse a -70 °C, pero se debe considerar que este procedimiento puede reducir la concentración bacteriana por debajo de los niveles de detección, principalmente si la carga inicial era baja. Excepcionalmente se puede solicitar el procesamiento de otros materiales como: liquido pericárdico, riñón, hígado, bazo, miocardio, tejidos blandos, válvulas cardíacas protésicas, médula ósea e intestino. Las recomendaciones para almacenamiento y envío son equivalentes a las de las biopsias de pulmón; sin embargo, algunos tejidos como el bazo contienen inhibidores del crecimiento y deberían ser procesados inmediatamente ¹⁴⁶. La muestra de orina, para detección de antígeno urinario, debe ser recolectada en un contenedor estéril, sin el agregado de preservantes. La muestra debe ser transportada al laboratorio inmediatamente a temperatura ambiente. En casos de demora del envío, la muestra debe ser refrigerada pero nunca congelada, ya que el congelamiento-descongelamiento puede afectar la sensibilidad y especificidad de la técnica. Las muestras de sangre para la búsqueda de anticuerpos deben ser recolectadas por el método de rutina y remitidas al laboratorio a temperatura ambiente. Una vez obtenido el suero se debe fraccionar en alícuotas y congelar a -20 °C. Es importante evitar los descongelamientos y congelamientos sucesivos ya que pueden alterar el título de anticuerpos.

Tabla 5. Métodos diagnósticos de legionelosis

Método	Cultivo	Antígeno urinario	PCR	Serología
Tiempo de realización	3-7 días	15 min - 1 hora	2-4 horas	3-10 semanas
Tipo de muestra	STRI, tejidos	Orina	STRI, tejidos	Sueros pareados de fase aguda y convaleciente (de 4 a 12 semanas)
Sensibilidad	20-95%	60-95%	70-95%	20-70%
Especificidad	100%	>99%	90-99%	95-99%

STRI: secreciones del tracto respiratorio inferior

Referencias: 82, 150, 183

Exámen microscópico

El examen microscópico para evaluar la calidad de la muestra de esputo antes de cultivar es una práctica estándar en los laboratorios de microbiología. Sin embargo, ante la sospecha clínica de legionelosis, el esputo debe ser cultivado, aunque no presente reacción inflamatoria, ya que la mayoría de los pacientes con legionelosis no producen esputos purulentos ⁷⁹. Recientemente, un grupo de investigadores realizó una revisión de las características microscópicas de 224 esputos recolectados durante 6 años y que resultaron positivos para *Legionella* sp. por cultivo y/o PCR. Este análisis demostró que hasta un 80% de las muestras de esputo hubiesen sido rechazadas si se hubiesen aplicado alguno de los criterios

microscópicos de calidad de la muestra y de esta forma, se hubiese perdido la oportunidad del diagnóstico correcto y oportuno ²⁴⁶.

Detección de antígeno urinario

Existen varios métodos inmunológicos comerciales para la detección de antigenuria. El anticuerpo de captura utilizado en estos ensayos es específico para *L. pneumophila* serogrupo 1, responsable de la mayoría de los casos humanos de legionelosis. Esta metodología ha permitido detectar rápidamente brotes de legionelosis y generar así una respuesta efectiva en el manejo y control de la enfermedad ^{8, 94, 149, 183}. El antígeno es un componente soluble y termoestable del LPS de *L. pneumophila* serogrupo 1. Es detectable desde el inicio de la sintomatología de la infección y en algunos pocos casos hasta muchos meses después, sin verse influidos los resultados por la administración de antibióticos ¹⁴⁹. Sin embargo, en la mayoría de los casos, el antígeno ya no es detectado en la orina después de 1 a 2 meses de iniciado el tratamiento ¹⁸³. Las técnicas de diagnóstico de antígeno en orina como la aglutinación con partículas de látex, hemaglutinación pasiva o radioinmunoanálisis han evolucionado notablemente ^{76, 149}. Actualmente, esos métodos fueron sustituidos por el enzimoimmunoanálisis y la inmunocromatografía, con una especificidad para *L. pneumophila* serogrupo 1 entre el 95% y el 100% y una sensibilidad entre el 70% y el 90% ¹⁴⁶. Si bien la sensibilidad del enzimoimmunoensayo es mayor, la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica implementaron la inmunocromatografía, dada la robustez y simplicidad de la técnica. Los resultados falsamente positivos representan un

porcentaje bajo y pueden deberse al congelamiento-descongelamiento de la muestra o a la presencia de excesivo sedimento urinario ^{216, 250}. Ante la sospecha de falsos positivos es recomendable que todas las muestras de orina positivas sean nuevamente analizadas después de hervir durante 5 min y centrifugar (5 min a 12 000 g) y solo se deben considerar válidos los sobrenadantes que permanecen positivos ¹⁸³. Como hallazgos, fueron documentados un caso de antigenuria falsamente positiva en un paciente colonizado o infectado con *Nocardia* sp.¹⁵ y unos pocos casos de pacientes colonizados con *P. aeruginosa* ⁵⁹. También fueron informados algunos pseudobrotos de legionelosis asociados a resultados falsamente positivos del antígeno urinario debidos a problemas con los equipos utilizados ^{229, 233, 242}. Estas experiencias destacan dos cuestiones importantes en el diagnóstico de EL que deben considerarse cuando se sospecha un brote. En primer lugar, la confiabilidad de una única prueba nunca es absoluta. Los resultados obtenidos pueden verse afectados en función de la calidad del *test* utilizado, pero también por los procedimientos aplicados por diferentes operadores. En segundo lugar, el diagnóstico de EL siempre debe basarse en ensayos complementarios como cultivo, serología y/o PCR. Los métodos comerciales para detección de antigenuria pueden exhibir reactividad cruzada para varios serogrupos de *L. pneumophila* y de esta forma ampliar la detección de casos de legionelosis. Sin embargo, la sensibilidad para detectar antígeno urinario en infecciones por otros serogrupos de *L. pneumophila* es altamente variable y, en general, mucho más baja que para *L. pneumophila* serogrupo 1 ¹⁸³. Recientemente, un grupo de investigadores japoneses desarrollaron un nuevo equipo para el diagnóstico de EL a partir de orina, que permite la detección de

todos los serogrupos de *L. pneumophila*. El diseño del inmunoensayo es un híbrido que puede detectar la fracción del LPS excretada por *L. pneumophila* serogrupo 1 y la proteína ribosomal L7/L12 presente en cepas de *L. pneumophila* de los serogrupos 1 al 15. El equipo mostró resultados prometedores, con una sensibilidad similar a los equipos comerciales aprobados por la *Food and Drug Administration* de los EE.UU. (FDA) para *L. pneumophila* serogrupo 1 y que, al menos, permitió la detección de antigenuria en un caso de neumonía por *L. pneumophila* serogrupo 2 ¹⁴⁴.

La detección del antígeno urinario es más sensible para infecciones por *L. pneumophila* serogrupo 1 del subgrupo mAc3/1 positivo y la sensibilidad cae hasta un 40% en pacientes con infecciones por cepas con resultados negativos para el subgrupo mAc 3/1 ⁶². En un estudio europeo multicéntrico en el cual se analizaron 1335 casos de legionelosis, se confirmó la prevalencia de *L. pneumophila* serogrupo 1. El 67% de los aislados reaccionaron con mAc 3/1 y el 12% resultaron MAb3/1 negativos. No obstante, la mayoría de las infecciones nosocomiales estuvieron asociadas a cepas MAb3/1 negativas ¹³⁴, por lo tanto, si bien el antígeno urinario es la prueba de primera línea para el diagnóstico de EL, es importante tener en cuenta que no debería descartarse la enfermedad con un resultado negativo de antigenuria si no se han incluido otras pruebas diagnósticas complementarias. Un gran estudio multicéntrico realizado en Bélgica evaluó el riesgo de subdiagnosticar EL si se utiliza el antígeno urinario como única prueba. Los centros participantes utilizaron un algoritmo diagnóstico de primera línea que incluía PCR múltiple para el diagnóstico sindrómico en muestras respiratorias bajas y el antígeno urinario. El 37,5% de las muestras de orina negativas para

antígeno urinario fueron positivas para *Legionella* sp. por métodos moleculares¹⁹⁷. El diagnóstico de estos casos se hubiese perdido o retrasado si sólo se hubiese incluido la detección de antígeno urinario

Cultivo e identificación

El diagnóstico definitivo de legionelosis se basa en el cultivo del microorganismo a partir de materiales clínicos en agar BCYE. El aislamiento permite la identificación microbiológica y la subtipificación por serotipificación o por medio de estudios de moleculares para la investigación de brotes y fuentes ambientales de infección.

Para optimizar la recuperación de *Legionella* a partir de especímenes clínicos es necesario que las muestras sean diluidas para reducir la inhibición por tejido, factores séricos y antibióticos. Las muestras de sitios que no son normalmente estériles, pueden requerir un tratamiento previo para reducir la microbiota acompañante^{36, 146}. La dilución (1:10) de los materiales clínicos líquidos en caldo tripticasa de soja aumenta la recuperación de *Legionella*. El tejido (1 g) debe disgregarse en caldo tripticasa de soja (1 ml) antes de la siembra en medio sólido. El tejido de bazo debe disgregarse y diluirse 1:10 para incrementar la probabilidad de aislamiento. El líquido pleural y la sangre que han sido descargados en botellas para hemocultivo, no necesitan dilución previa a la siembra en los medios de cultivo. El esputo debe ser tratado para disminuir la microbiota contaminante. El procedimiento de descontaminación puede realizarse mediante la dilución 1:10 de la muestra con una solución tamponada KCL-HCL (pH 2,2) y un paso de incubación a temperatura ambiente de 4 minutos. El tiempo de descontaminación

es crítico. Otro método alternativo es el calentamiento a 50 °C por 30 minutos ¹⁴⁶.

El medio BCYE es un medio tamponado que neutraliza la acidez de la muestra descontaminada. La manipulación de los cultivos requiere un nivel de bioseguridad 2 y todas las prácticas deben realizarse en cabina de bioseguridad ²⁸⁰.

El medio utilizado para el cultivo de muestras clínicas es el agar BCYE suplementado con ácido alfa-cetoglutarico (BCYE α), que incrementa el desarrollo de la bacteria en los cultivos primarios. Cuando se requiere de un medio selectivo, se recomienda el agregado de agentes antimicrobianos. Las drogas utilizadas son: polimixina B, vancomicina, glicina y cicloheximida ⁷⁹.

La temperatura de incubación es 35-37 °C en atmósfera húmeda. *L. pneumophila* es capaz de desarrollar en ausencia de CO₂, pero es conveniente incubar en atmósfera con 2,5% de CO₂ para estimular el desarrollo de las especies más capnófilas (*L. sainthelensi* y *L. oakridgensis*). Niveles de CO₂ mayores de 5% pueden inhibir el desarrollo de *L. pneumophila*.

Las colonias de *Legionella* spp. suelen aparecer antes del día 5 de incubación, sin embargo, es necesario incubar hasta 14 días. En el día 3, las colonias son chatas, de bordes enteros, de 0,5 a 1mm de diámetro. En el día 4, estas colonias son de 1-3 mm de diámetro, convexas y lisas, con bordes enteros y presentan iridiscencia. En los días 5-6, el diámetro aumenta a 5-7 mm y los bordes son irregulares, el aspecto es bulboso y no homogéneo y la iridiscencia ya no es detectable. *Eikenella corrodens*, *P. aeruginosa*, *Flavobacterium* spp. y algunas especies de *Bacillus* pueden desarrollar en agar BCYE y presentar colonias similares a las de *Legionella*. Sin embargo, no dependen de L-cisteína para su crecimiento y a diferencia de *Legionella*, desarrollan en medios convencionales.

Las micobacterias de rápido crecimiento y *Nocardia* spp. crecen bastante bien en este medio, por lo que algunos autores sugieren la utilización de BCYE como medio de elección para el diagnóstico de laboratorio de la nocardiosis ²⁷⁰.

La sensibilidad del cultivo de muestras respiratorias oscila entre el 20 y el 80%, según el tipo de muestra ^{36, 146}. Además, la gravedad de la infección tiene un alto impacto en la recuperación de *Legionella* en cultivo. Los casos de neumonía grave producen esputos con mayor carga bacteriana que los casos más moderados. Otros factores que afectan la sensibilidad del cultivo son: terapia antibiótica previa, requerimientos nutricionales particulares de la cepa y el entrenamiento técnico del personal del laboratorio ^{36, 183, 272}.

Legionella es bioquímicamente inerte y no es posible la identificación con pruebas bioquímicas convencionales. Existen algunos equipos comerciales para la identificación por inmunofluorescencia o aglutinación con látex con antisueros específicos, pero los mismos son efectivos para un número limitado de especies y serogrupos. Además, la reacción cruzada con otros géneros es frecuente y fue documentada por diversos autores ^{40, 183, 194}. La secuenciación de genes específicos como el *16S rRNA*, de la región intergénica 23S-5S, 5S ARNr y del gen *mip*, constituye una importante herramienta taxonómica ^{52, 146, 253, 282}. La identificación de *L. pneumophila* por espectrometría de masas (EM) MALDI-TOF es una alternativa de rutina rápida, exacta y robusta para el laboratorio de microbiología clínica ^{74, 98, 106, 187, 264}. Recientemente, Pascale *et al.* informaron una correlación de 96,8% en la identificación de las especies de *Legionella* incluidas en las bases de datos de las plataformas comerciales de EM MALDI-TOF. Aquellas especies ausentes o pobremente representadas en las bases de datos

fueron identificadas a nivel de género o no identificadas ²⁰⁸. Los aislados de *Legionella* pueden ser preservados a -70 °C en caldo tripticasa de soja con glicerol al 10% o en leche descremada durante varios años. Los subcultivos en estrías de agar BCYE pueden sobrevivir hasta dos meses si se mantienen a temperatura ambiente en la oscuridad ¹³².

Pruebas serológicas

Los estudios sobre la respuesta inmune a *Legionella* indican que durante la infección existen respuestas inmunes humorales específicas de antígeno y mediadas por células ¹⁹⁹. La mayoría de los pacientes desarrollan respuestas tanto de IgG como de IgM, pero algunos desarrollan un tipo único de anticuerpo, ya sea IgM, IgG o IgA, por lo que es necesario analizar la respuesta total de inmunoglobulinas y no solo IgG ⁷⁹. Aunque la producción de inmunoglobulinas sigue el patrón general para las enfermedades infecciosas, fueron documentados varios casos de legionelosis en los cuales los pacientes presentaron títulos altos persistentes de IgG e IgM ¹⁵³. Por lo tanto, no es posible asignar un valor de corte confiable de un solo título de IgG o IgM como evidencia diagnóstica de EL en curso o reciente. También se demostró reacción cruzada y falsos positivos en individuos con infecciones por *Bacteroides fragilis*, *C. psittaci*, *P. aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística y en infecciones por micobacterias, micoplasmas, *Campylobacter* spp., *Haemophilus influenzae*, *C. burnetti* y *Rickettsia typhi* ⁹⁴.

La seroconversión refiere a un aumento de cuatro títulos entre la fase aguda y convaleciente de la enfermedad. El segundo título debe ser mayor o igual a la

dilución 1/128. La inmunofluorescencia indirecta (IFI) es considerada como el método patrón de oro (*gold standard*) ⁴¹. Existen enzimoimmunoensayos comerciales disponibles que ofrecen la ventaja de la automatización e independencia de la experiencia del operador; sin embargo, algunos estudios han señalado que tienen menor sensibilidad que la IFI ²⁵⁷. La principal limitación de este método es que la cuadruplicación del título de anticuerpos entre suero de fase aguda y convaleciente puede llevar de 4 a 8 semanas, por lo cual se torna inviable como herramienta diagnóstica para el manejo clínico del paciente. Además, las condiciones de inmunosupresión pueden ocasionalmente retrasar o evitar que se produzca la cuadruplicación del título, a pesar de la existencia de una infección franca ¹²¹.

Numerosos estudios epidemiológicos informaron títulos elevados de inmunoglobulinas entre el 1% y el 30% de la población sana, dependiendo de la edad, ubicación, entorno de trabajo y, ocasionalmente, género ¹⁸³. Un meta-análisis reciente sobre investigaciones de seroprevalencia frente a *Legionella*, reveló que ciertos subgrupos ocupacionales parecerían tener una mayor respuesta de anticuerpos a *L. pneumophila*: conductores de autobuses, buzos profesionales, profesionales de odontología, personal de hospitales, trabajadores de hoteles y trabajadores de entornos industriales/comerciales ¹²¹. La exposición continua a fuentes contaminadas con *Legionella* puede desencadenar respuestas inmunitarias, y la producción de anticuerpos puede persistir a niveles detectables durante varios meses y hasta 10 años después de la exposición, sin causar ningún síntoma clínico ⁶⁴. Un estudio de seroprevalencia entre los visitantes de una feria comercial floral de 1999, donde un *spa* con hidromasaje en exhibición provocó un

gran brote de EL, mostró que la exposición a la bacteria era capaz de provocar un aumento de los niveles de anticuerpos en individuos que no desarrollaron legionelosis y que los títulos fueron mayores en las personas más cercanas a la fuente ²⁷.

Reconociendo sus limitaciones, la serología sigue siendo relevante para la confirmación de EL en aquellos casos en los cuales el antígeno urinario resultó negativo y la bacteria no fue recuperada en cultivo. La serología también puede ser valiosa para investigaciones epidemiológicas, identificar patrones de enfermedad, estudiar brotes potenciales en curso y conocer la seroprevalencia general.

Detección de ácidos nucleicos

Las primeras investigaciones sobre el potencial de la técnica de PCR como herramienta para la detección de *Legionella* fueron realizadas en muestras ambientales y combinaron la amplificación por PCR con hibridación con sondas específicas ²⁵². El progreso de las estrategias basadas en PCR continuó en la década de 1990 y comenzó a ser utilizada como herramienta diagnóstica para la detección del *Legionella* directamente en muestras clínicas. En 1992, Jaulhac *et al.* pudieron detectar *L. pneumophila* de los serogrupos 1 a 14, *L. micdadei* y *L. bozmannii* en muestras de lavado broncoalveolar (LBA) artificialmente contaminadas. Utilizaron el gen *mip* como blanco de amplificación. Luego, realizaron un análisis retrospectivo de 68 muestras de LBA de pacientes con sospecha de EL y detectaron ADN de *Legionella* spp. en 8 muestras con cultivo

positivo y 7 muestras con cultivo negativo, las cuales pertenecían a pacientes con evidencia serológica de legionelosis ¹⁴⁷. La amplificación por PCR del gen *mip* seguida de secuenciación permitió identificar todas las especies y serogrupos del género *Legionella* y se la considera como el método de referencia para la identificación de especies y una herramienta muy útil para investigaciones epidemiológicas ²²⁷. El gen *mip*, debido a su estabilidad genética y especificidad es considerado un blanco muy confiable para la identificación de *Legionella* a nivel de especie ¹⁰⁵. La lista de genes utilizados, tanto en PCR comerciales como PCR caseras incluyen un segmento conservado de los genes ribosomales que codifican para las subunidades 5S y 16S, el espaciador 16S-23S, y/o el gen *mip* ^{103, 146, 147, 183, 225, 227}. Una base de datos curada con secuencias del gen *mip*, protocolos, secuencias de cebadores, *software* para la alineación de secuencias y otras herramientas para el análisis genómico están disponibles en línea en el sitio: https://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20140714110648/http://www.hpa.org.uk/web/HPAweb&HPAwebStandard/HPAweb_C/1195733805138.

A diferencia de la prueba del antígeno urinario, la técnica de PCR ofrece el potencial para detectar *L. pneumophila* de todos los serogrupos y otras especies del género en cualquier tipo de muestra o fuente ambiental. Esto es especialmente importante en áreas del mundo en el que un mayor porcentaje de casos de EL son causados por otros serogrupos de *L. pneumophila* u otras especies de *Legionella* ^{36, 62, 183}. Una revisión sistemática realizada para evaluar el desempeño de la PCR en muestras respiratorias (especialmente esputos y LBA) en comparación con el antígeno urinario, describió la mayor sensibilidad de la PCR para el diagnóstico de la legionelosis y mostró como su implementación permitió el diagnóstico adicional

de 18% a 30% de casos que habían sido considerados negativos por antígeno urinario ¹³.

La sensibilidad y especificidad de la PCR para *Legionella* spp. depende del diseño de la metodología y el tipo de muestra utilizada. Para muestras del tracto respiratorio inferior, la sensibilidad es del 80% al 100% y la especificidad cercana al 100%. La sensibilidad de la PCR a partir de esputo y LBA no mostró diferencias significativas, lo cual es importante para estimular la derivación al laboratorio de una muestra de esputo junto a la orina, cuando el LBA no esté disponible ²¹¹. El tipo de método de extracción y purificación de ADN a partir de las muestras también puede contribuir al valor de la sensibilidad de la PCR. Varios estudios compararon distintas estrategias de extracción de ADN de *Legionella* y demostraron que los métodos automatizados fueron equivalentes y, algunas veces superiores, a los métodos manuales ^{146, 278}. Sin embargo, dos grupos de investigadores, en forma independiente, detectaron ADN de *Legionella* en controles negativos y demostraron que la fuente de contaminación eran las columnas de extracción de un lote de un equipo comercial para extracción y purificación de ADN ^{90, 267}. En un estudio realizado por Shen *et al.*, se detectó al gen *mip* en bajo número de copias en los controles negativos y el fenómeno persistió cuando analizaron dos lotes separados de reactivos de PCR y agua de dos compañías bioquímicas diferentes. Luego de tratar el agua Millipore Milli-Q a través de un filtro de policarbonato con un tamaño de poro de 0,2 µm no se observó contaminación en la reacción de PCR ²⁴⁹. Dado que *Legionella* spp. puede estar distribuida en los suministros de agua municipales, el agua purificada disponible comercialmente también puede albergar un nivel bajo de contaminación

con ADN de células de *Legionella* que superaron los procesos de purificación. Estos hallazgos enfatizan la importancia de incluir suficientes controles negativos en los métodos de PCR para la detección y diagnóstico de *L. pneumophila* y otras especies del género *Legionella*, con el fin de evitar informar falsos positivos. Otra fuente de falsos positivos es la contaminación de muestras clínicas con agua del grifo que contenga *Legionella* spp. También se han informado pseudobrotos de legionelosis asociados a la contaminación de fibroscopios ^{185, 241, 276}.

Algunos investigadores analizaron la sensibilidad de la PCR para muestras como suero, sangre y orina, y obtuvieron valores no mayores del 50% ^{5, 177}. La PCR a partir de hisopados orofaríngeos fue evaluada en un estudio retrospectivo que incluyó 242 adultos ingresados en el hospital con neumonía adquirida en la comunidad y mostró una sensibilidad de solo 27% ⁷³. En otra investigación se realizó un estudio comparativo de la sensibilidad de la PCR para detectar *Legionella* en muestras de esputo e hisopados nasofaríngeos y se demostró que estos últimos no son especímenes confiables para el diagnóstico ⁴⁹.

El método LAMP (del inglés, *loop-mediated isothermal amplification*) o amplificación isotérmica mediada por bucle, es un proceso similar a la PCR, pero requiere menor tiempo de procesamiento, sin necesidad de equipos complicados y procedimientos post-amplificación. Fue desarrollado en el año 2000 ²⁰³ y a partir de ese momento numerosos protocolos fueron diseñados para la detección de diferentes bacterias y virus. En comparación con la PCR, LAMP requiere instrumentación menos sofisticada (no requiere termociclador), las temperaturas máximas de reacción son más bajas (60 °C) y es más resistente a los inhibidores ^{99, 166}. Varios protocolos para la detección de ADN por LAMP de *L. pneumophila* y

Legionella spp. fueron desarrollados y aplicados, principalmente en muestras ambientales. En los últimos años varios grupos de investigadores han evaluado la técnica LAMP en muestras clínicas para el diagnóstico de EL ^{152, 172, 189, 230}. Los resultados fueron buenos y promueven esta metodología económica, junto al antígeno urinario, como herramientas diagnósticas para el punto de atención (*point of care*).

La técnica de PCR a tiempo real (rt-PCR) ganó popularidad a principios de la década de 2000 y se ha utilizado para detectar y cuantificar *Legionella* tanto en muestras ambientales como clínicas ^{54, 72, 181, 195, 211, 225, 253}. Aunque es un método que requiere experiencia técnica, termocicladores costosos y *softwares* complejos, el mercado desarrolló y comercializó rápidamente equipos para la detección de este microorganismo en muestras ambientales.

Actualmente no hay consenso sobre el valor de un gen o marcador por sobre otro para la detección de *Legionella* a través de métodos genéticos, con excepción del gen *mip* que es ampliamente utilizado para la detección de *L. pneumophila* o de otras especies. La selección de los genes blanco para los métodos moleculares depende de los objetivos específicos del laboratorio. Por ejemplo, debido a que *L. pneumophila* serogrupo 1 del complejo clonal ST1 (Lp1ST1) está diseminada a nivel mundial y representa el subtipo principal aislado en los casos de EL adquirida en la comunidad y en el hospital, el grupo europeo para el Estudio de Infecciones por *Legionella* (EWGLI) desarrolló y validó un ensayo de rt-PCR sensible y específico para la detección de Lp1ST1 mediante la amplificación del gen *lpp1868* ¹¹⁶. Por otro lado, el CDC de los EE.UU., ante la demanda de laboratorios de menor complejidad, desarrolló una rt-PCR múltiple con el objetivo de simplificar el

flujo de trabajo para la detección y tipificación simultáneas de *Legionella* spp. en aislamientos, muestras clínicas y muestras ambientales contaminadas. El ensayo incluyó como blancos de amplificación a los genes *ssrA* (amplifica con todas las especies de *Legionella*), el gen *mip* (amplifica específicamente con *L. pneumophila*) y el gen *wzm* (amplifica específicamente con *L. pneumophila* serogrupo 1) ^{20, 54}. Posteriormente, el mismo grupo desarrolló una rt-PCR múltiple como complemento de su ensayo inicial para detectar y discriminar *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. longbeachae*, *L. feelei*, *L. anisa*, *L. parisensis*, *L. tucsonensis* y *L. sainthelensis*. Utilizando un panel de 300 cepas tipo de *Legionella* spp., y aislamientos clínicos y ambientales, los investigadores determinaron que el ensayo era 100% específico para la diferenciación de estas especies y serogrupos. Sin embargo, la sensibilidad analítica difirió en términos de límite de detección (LD) de ADN genómico. Por ejemplo, el LD para *L. micdadei*, *L. dumoffii*, *L. feeleii*, *L. longbeachae* y *L. bozemanii* (las especies más frecuentes de EL no causada por *L. pneumophila* serogrupo 1) fue de 50 fg de ADN. Para *L. anisa*, *L. parisensis* y *L. tucsonensis*, el LD fue de 500 fg, mientras que para *L. sainthelensis* serogrupo 1 y *L. sainthelensis* serogrupo 2, el LD fue de 500 y 5 pg respectivamente ²¹. Numerosos estudios sugieren que otras especies de *Legionella* y serogrupos distintos de *L. pneumophila* serogrupo 1, son responsables de una parte sustancial de los casos clínicos. *L. longbeachae* fue la especie predominante identificada entre los pacientes con neumonía grave en Tailandia en 2004 ²¹⁴ y en Australia presenta la misma prevalencia que *L. pneumophila* ²⁸⁴. Por lo tanto, es necesario conocer la epidemiología local para evaluar y optimizar los métodos de diagnóstico moleculares de forma tal de

conocer la contribución de cada especie de *Legionella* a la distribución global de la EL.

En la década de 2010 se han desarrollado varias pruebas moleculares sindrómicas rápidas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, entre ellas la neumonía. Estos sistemas proporcionan información a los médicos en "tiempo real" sobre los patógenos presentes y su probable sensibilidad a los antibióticos, al detectar también marcadores genotípicos de resistencia ²¹⁷. Una de las limitaciones de alguno de estos métodos es que están diseñados para detectar sólo la especie *L. pneumophila*. En la tabla 6 se detallan los equipos comerciales para la detección molecular de *Legionella* aprobados por la FDA de los EE.UU. hasta la fecha.

Tabla 6. Métodos moleculares comerciales aprobados por la FDA de los EE.UU. para la detección de *Legionella* en muestras clínicas

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

⁽¹⁾ https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K191967.pdf

⁽²⁾ https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K180966.pdf

⁽³⁾ https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K183597.pdf

Detección de *Legionella* spp. en aguas

La rápida detección e identificación de *Legionella* spp. en aguas es fundamental para identificar la fuente de infección durante un brote epidémico e implementar medidas de desinfección y control. También es importante durante los monitoreos de puntos críticos del sistema hídrico en instalaciones que representen un riesgo para la colonización y posterior diseminación de aerosoles de *Legionella* spp.

El método internacional estándar es el protocolo descrito en la norma ISO 11731, que permite detectar y enumerar células viables de *Legionella* por medio del cultivo en medios selectivos¹⁴³. Sin embargo, este método presenta limitaciones, principalmente por los tiempos de incubación prolongados, debido a las características exigentes del crecimiento de las bacterias de este género. Además, en algunos casos, el método de cultivo no es práctico ya que el crecimiento de *Legionella* puede ser inhibido por la presencia de otras bacterias, por lo que es necesario realizar un pretratamiento de la muestra para evitar la inhibición del crecimiento o la contaminación bacteriana²⁵⁵. Otra desventaja es que *Legionella* puede persistir en el agua en un estado viable pero no cultivable (VNC) y bajo ciertas condiciones, las células VNC pueden recuperar la virulencia y la capacidad infectiva^{78, 157}. Las células VNC no son detectadas por el método ISO lo cual puede dar lugar a resultados falsamente negativos. La rt-PCR, si bien es un método rápido y sensible, no es capaz de distinguir entre microorganismos viables y no viables. El ADN de células no viables puede ser muy estable y persistir en las muestras ambientales durante largos períodos de tiempo²⁷⁶. Los métodos de rt-

PCR que incorporan pretratamientos de la muestra con agentes intercalantes de las moléculas de ADN, como la monoazida de propidio o de etidio, pueden distinguir entre células bacterianas vivas y muertas. No obstante, también presentan desventajas, por ejemplo, la presencia de biopelículas puede afectar la detección de células viables de *Legionella* spp.^{258, 276}.

Boss *et al.* desarrollaron un método molecular como alternativa al método ISO que se basó en una estimulación nutricional previa y la detección de un aumento del precursor 16S ARNr como indicador de viabilidad. Para la cuantificación, el ADN se detectó mediante rt-PCR. El método permitió obtener resultados dentro de las 8 h posteriores al procesamiento de la muestra, a diferencia de los 10 días requeridos por el método ISO estándar. La sensibilidad y la especificidad demostradas fueron de 91 y 97%, respectivamente²⁸. Recientemente, Sanchez-Parra *et al.* diseñaron un ensayo de rt-PCR para verificar la presencia de *L. pneumophila* directamente en muestras de aire exterior con baja concentración de ADN. La aplicación de este protocolo no requiere cultivo y permite resultados rápidos para activar las alertas públicas correspondientes para prevenir brotes de legionelosis²³⁸.

La PCR digital (dPCR) es una tecnología de última generación que permite la cuantificación absoluta mediante la partición de la muestra en miles de sub-réplicas funcionales, eliminando así la necesidad de utilizar réplicas técnicas y curvas de calibración. Asimismo, la dPCR demostró mayor precisión y robustez en presencia de inhibidores de PCR. Actualmente, la dPCR es uno de los métodos más sensibles utilizados para la detección de bajas cantidades de blancos, incluido ADN circulante, microARN, mutaciones circulantes, variantes de número

de copias raras y blancos de ácido nucleico vírico bajo, por lo que representa una tecnología prometedora para su uso en la práctica clínica y en salud pública y ambiental^{68, 126}. Falzone *et al.* compararon la sensibilidad y precisión de la dPCR y la rt-PCR en muestras de agua con concentraciones conocidas de *L. pneumophila* y en un modelo *in vitro* de tratamientos térmicos de agua. La dPCR mostró una mayor sensibilidad y precisión en comparación con la rt-PCR en la detección de baja carga bacteriana y no se vió afectada por la presencia de ADN fragmentado luego del tratamiento térmico del agua. De esta forma, los investigadores propusieron la dPCR como una estrategia innovadora para detectar eficazmente *L. pneumophila* en muestras de agua⁹¹.

Si bien resultan evidentes las ventajas de los métodos moleculares, existen discrepancias entre los resultados informados en la literatura. Aún es necesario un consenso internacional para el desarrollo de protocolos estandarizados que permitan garantizar la consistencia de los resultados tanto con fines diagnósticos como de investigación de riesgo ambiental.

Subtipificación

Los métodos de subtipificación para *Legionella* spp. son herramientas de laboratorio utilizadas para establecer la relación entre las fuentes ambientales y los casos clínicos durante la ocurrencia de un brote y deben ir siempre acompañados de una investigación epidemiológica.

Con raras excepciones, todos los métodos de subtipificación utilizados para *Legionella* fueron aplicados a la especie *L. pneumophila*. En la mayoría de los laboratorios microbiológicos se utiliza la prueba de aglutinación de látex para la asignación rutinaria de serogrupos de *L. pneumophila*¹⁴⁶. La clasificación en subgrupos mediante anticuerpos monoclonales (mAc)^{134, 151} y la subtipificación basada en secuencias (SBT)¹⁰⁵ son los métodos más ampliamente establecidos para la comparación de aislamientos clínicos y ambientales de *L. pneumophila* en las investigaciones epidemiológicas de brotes. El seroagrupamiento por mAc tiene la ventaja de ser económico y fácil de realizar, aunque el índice de discriminación es bajo en comparación a los métodos genotípicos. Sin embargo, es muy útil en las investigaciones de brotes donde se deben caracterizar muchas cepas, ya que es un método de bajo costo que permite excluir rápidamente cepas ambientales no relacionadas con las clínicas. El patrón de reactividad a los mAc de las cepas de *L. pneumophila* se mantiene estable durante los pasajes *in vitro* en medios artificiales, aunque la mutación en genes que codifican para proteínas involucradas en la síntesis de LPS podría influir en la reactividad²⁷³. Los patrones de reactividad se nombran según una cepa de referencia y, por lo tanto, esa información se puede intercambiar fácilmente entre laboratorios¹⁵¹. El único panel de mAc disponible, producido por un único laboratorio en Alemania y que se correlaciona bien con el panel internacional originalmente descrito¹⁵¹, es el denominado panel de Dresde¹³⁵. Según el perfil de reactividad con los mAc del panel de Dresde, los aislamientos de *L. pneumophila* serogrupo 1 se pueden clasificar en los siguientes subgrupos: Philadelphia, Allentown, Benidorm, Knoxville, France, OLDA, Oxford, Heysham, Camperdown o Bellingham¹⁷³.

La tipificación basada en secuencia (SBT) es un método similar al MLST (del inglés, *multilocus sequence typing*) que fue propuesto por el EWGLI como método patrón de oro para la subtipificación de *L. pneumophila* ¹⁰⁵. El EWGLI mantiene una base de datos de alelos (<http://www.ewgli.org>) que permite ingresar grandes conjuntos de datos de secuencia sin procesar y entrega un perfil alélico y un secuenciotipo (ST) para cada aislamiento. La base de datos es dinámica y se actualiza continuamente con la adición de nuevas secuencias de alelos y ST. La discriminación de las cepas se basa en el análisis de las secuencias de los genes *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA* y *neuA*, con la opción de incluir un homólogo del gen *neuA* (*neuAh*) cuando los cebadores utilizados en el protocolo estandarizado no amplifican el gen en las cepas de *L. pneumophila* que no pertenecen al serogrupo 1 ^{133, 228}. La ventaja principal del SBT es que permite la comparación de datos objetivos entre laboratorios y elimina las subjetividades de los métodos moleculares de subtipificación no basados en secuencias, como la electroforesis en campos pulsantes (PFGE, del inglés, *pulse field gel electrophoresis*), en los cuales existen ambigüedades en la interpretación del perfil de restricción entre distintos laboratorios ¹⁸³. La implementación del SBT marcó un avance importante en el estudio de la epidemiología molecular de la EL, que ha producido datos útiles y comparables en todo el mundo y ha demostrado ser aplicable en la investigación de brotes de legionelosis ^{53, 131, 190}.

La secuenciación de próxima generación (NGS, del inglés, *next generation sequencing*) o secuenciación masiva, ha revolucionado la microbiología desde el desarrollo de plataformas y herramientas bioinformáticas que permitieron que la secuenciación del genoma completo de patógenos de importancia para la salud

pública sea una herramienta más fácilmente disponible ²⁵. Actualmente, estas tecnologías permiten acceder a la información genómica a un precio y a una escala tales que se están implementando en la práctica clínica y epidemiológica rutinaria. A partir del siglo XXI, el papel más importante de las tecnologías NGS en microbiología es la vigilancia de enfermedades transmisibles y la investigación de brotes ⁵⁶. La mayoría de los estudios que utilizan la epidemiología molecular basada en la secuenciación de genomas, se basan en el mapeo de los datos leídos frente a una referencia seguida por el análisis de polimorfismos de nucleótido único (SNP, del inglés, *single nucleotide polymorphism*). Algunos estudios utilizan un enfoque de análisis de alelos, gen por gen, en todo el genoma para cepas de *L. pneumophila* serogrupo 1. Estos esquemas MLST extendidos, permiten una comparación detallada de dos o más aislamientos considerando todos los genes de una especie (pangenoma) en lo que se llama MLST de genoma completo (wgMLST) o, alternativamente, un conjunto de genes conservados de una especie, a saber, MLST de genoma central (cgMLST) ^{175, 191}. El análisis de cepas relacionadas epidemiológicamente utilizando estos esquemas cgMLST o wgMLST produjo resultados coincidentes con el método SBT estándar, lo que indica la idoneidad de estos métodos como herramientas de tipificación para aislamientos de *L. pneumophila* serogrupo 1 ^{182, 213, 226, 231}. Estos métodos genómicos ofrecen resultados de alta resolución, pero aún son costosos, consumen mucho tiempo en el análisis y requieren de personal con experiencia y conocimiento bioinformático para interpretar los resultados ¹²⁰. Recientemente, Kyritsi *et al.* desarrollaron y validaron un método rápido y robusto basado en EM MALDI-TOF combinado con algoritmos de aprendizaje automático para la

asignación de serogrupo y la identificación de distintos picos biomarcadores para la detección de los factores de virulencia codificados por los *loci lvh* y *rtxA* a partir de aislamientos de *L. pneumophila*. Para la asignación de serogrupos, el método mostró una sensibilidad del 87,5%, una especificidad del 86,7% y una precisión del 87,1%. Con respecto a la detección de *loci* de patogenicidad, el algoritmo de clasificación presentó una sensibilidad del 82,5%, una especificidad del 100% y una precisión del 84,1% ¹⁶¹.

Todos los métodos de subtipificación molecular descritos anteriormente, tienen un gran poder discriminatorio, pero fueron diseñados para ser aplicados luego del cultivo positivo de las muestras. El principal inconveniente de los estudios de epidemiología molecular de *Legionella* reside en la baja eficiencia de recuperación de cultivos microbiológicos, incluso cuando el protocolo es realizado por personal de laboratorio experimentado. El método de SBT anidado o *nested-SBT* es una modificación del método SBT, diseñado para poder ser aplicado directamente a muestras respiratorias ¹¹⁷. El EWGLI, ha mejorado y optimizado recientemente el protocolo *nested-SBT* descrito originalmente por Ginevra *et al.* ¹¹⁷. Varios estudios evaluaron la eficacia de este método en muestras respiratorias en las cuales *L. pneumophila* fue recuperada en cultivo, de forma tal de comparar los resultados ^{61, 117, 145}. Adicionalmente, Quero *et al.* evaluaron la capacidad de la *nested-SBT* para obtener datos epidemiológicos moleculares en muestras con cultivo negativo. Los investigadores analizaron 62 muestras respiratorias de pacientes con EL confirmada por antigenuria positiva. Por cultivo, recuperaron *L. pneumophila* en el 3% de las muestras. Sin embargo, la amplificación de genes por *nested-SBT* y su secuenciación permitió asignar un ST al 92% de las muestras analizadas. Los

autores concluyeron que la *nested-SBT* debería ser una técnica aplicada en las muestras clínicas de casos de neumonía con sospecha de legionelosis en las cuales la antigenuria fuera positiva ²²⁴.

Cuando los laboratorios de microbiología clínica realizan los estudios de subtipificación molecular, la mayoría basan el análisis en una sola cepa clínica o en una pequeña cantidad de cepas clínicas de cada paciente. Sin embargo, la existencia de una importante diversidad de cepas de *L. pneumophila* en el ambiente hospitalario, tendría importantes implicancias para la interpretación de datos de tipificación molecular ^{182, 209}. Algunos autores informaron infecciones mixtas por diferentes ST de *L. pneumophila* cuando realizaron SBT directamente de la muestra respiratoria ^{61, 179}. Para evaluar esa diversidad, David *et al.* realizaron SBT junto con la secuenciación del genoma completo de múltiples colonias de *L. pneumophila* recuperadas de cada uno de un grupo de 10 pacientes. Los resultados no mostraron diversidad genómica de *L. pneumophila* dentro del huésped y sugirieron que el análisis de una colonia por paciente a menudo es suficiente para obtener datos de subtipificación confiables para la investigación de brotes de legionelosis ⁶⁶. Sin embargo, la diversidad de *L. pneumophila* dentro del hospedador probablemente dependa de varios factores ambientales, clínicos y epidemiológicos, incluida la diversidad de esta especie en fuentes ambientales, la variación en la dosis infecciosa entre pacientes y la duración de la infección antes de la toma de la muestra. Los procedimientos utilizados para el cultivo también pueden favorecer el crecimiento de algunas cepas por sobre otras, reduciendo la diversidad. Todas estas limitaciones podrán

superarse en estudios futuros mediante el uso de la metagenómica en múltiples muestras del mismo paciente obtenidas a lo largo del tiempo ¹⁹².

Sensibilidad a los antibióticos

La resistencia a los antibióticos en patógenos bacterianos es un problema global asociado con una alta morbilidad y mortalidad. La presencia de agentes antimicrobianos en el medio ambiente puede promover la evolución de mecanismos de resistencia microbiana ⁶⁹. Esto es particularmente importante para *Legionella* spp. que coloniza la mayoría de los sistemas hídricos artificiales, donde pueden estar expuestos a agentes antimicrobianos de diversos orígenes artificiales o incluso a los secretados por otros microorganismos ^{7, 206}. La preocupación sobre la emergencia de resistencia a los antibióticos relacionada con el consumo de agua potable ha aumentado en la comunidad científica, aunque el número de artículos relevantes en la literatura aún no es significativo ²³⁹.

El esquema de tratamiento antibiótico para legionelosis cambió significativamente a lo largo del tiempo. Tras el primer brote de EL, ocurrido en 1976 entre legionarios estadounidenses en Filadelfia, se propuso la eritromicina como el fármaco de elección ³⁶. Actualmente los antibióticos recomendados son azitromicina o levofloxacina. Estas drogas son altamente eficaces y se han convertido en el pilar del tratamiento de legionelosis en individuos sanos e

inmunodeprimidos ya que producen menos efectos colaterales que la eritromicina
79, 215, 279

Existen varios métodos para la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) tales como el método epsilométrico, la dilución en caldo, la dilución en agar y la difusión con discos. No obstante, ninguno de estos métodos se considera un estándar de oro ³³. La determinación de la sensibilidad a los antibióticos de los aislados de *L. pneumophila* puede arrojar resultados que no se correlacionan clínicamente, debido a la característica intracelular de la bacteria durante la infección ¹⁵⁶. Además, los medios necesarios para cultivar *Legionella* pueden inactivar muchas drogas ²⁰⁶. No hay indicación de realizar pruebas de sensibilidad para *Legionella* excepto en un laboratorio de investigación. Por ello, el microbiólogo no debe asumir que un determinado fármaco será eficaz para el tratamiento de EL simplemente porque la droga es activa contra *L. pneumophila in vitro*, ni debe suponer que las drogas que tienen una CIM baja serán clínicamente más efectivas que aquellas con CIM más altas ⁷⁹. Recientemente fue aislada una cepa resistente a fluoroquinolonas en un paciente con EL tratado con ciprofloxacina y también fueron detectadas mutantes resistentes *in vivo* a estos antibióticos en otros dos pacientes ^{33, 245}. Estos eventos incrementaron los estudios de monitoreo de la emergencia de resistencia de los antibióticos clínicamente utilizados para el tratamiento. Pappa *et al.* realizaron una importante revisión sistemática de la literatura disponible durante el período 1976-2019, con el objetivo de analizar el patrón de sensibilidad a los antibióticos de los aislados de *L. pneumophila* de muestras clínicas y/o de agua, los métodos empleados y los puntos de corte utilizados para la interpretación ²⁰⁶. El método más citado fue el de

microdilución en caldo ⁵¹, seguido por el método epsilométrico Etest (Bio Merieux) y el método de dilución en agar. Con respecto a la interpretación de los resultados, algunos autores utilizaron el procedimiento sugerido por EUCAST ⁸⁸ y otros autores se basaron en publicaciones previas ³². El medio más utilizado fue BCYE con o sin alfa-cetoglutarato, a pesar que fue demostrado que la utilización de un medio con carbón afecta significativamente los valores de CIM ^{109, 269}. Esta revisión evidenció una falta de estandarización en la aplicación de los métodos a lo largo del tiempo. El EUCAST publicó una guía actualizada sobre la determinación de la CIM para *L. pneumophila*; sin embargo, como afirma el comité, debería utilizarse únicamente como guía para detectar la resistencia a los antibióticos en estudios de vigilancia más que como guía para el tratamiento ⁸⁸. Considerando estas limitaciones y debido a la simplicidad del método, algunos autores sugieren monitorear la aparición de resistencia en aislados ambientales de *L. pneumophila* por medio de Etest en agar BCYE de forma tal de predecir la aparición de la resistencia a los antibióticos clínicamente útiles en el medio ambiente antes de que se manifieste en las muestras humanas ²⁴⁷.

Prevención y control

Numerosos países recomiendan distintas estrategias para prevenir la legionelosis, las cuales difieren en los procedimientos, la frecuencia de muestreo ambiental y los niveles de alerta. Si bien la legionelosis es un problema global, las recomendaciones dependen de las regulaciones locales. Muchos países tienen

pautas o estándares para el control de *Legionella* en sistemas de agua y prevención de la legionelosis. Desde 1985, los estudios microbiológicos demostraron que *Legionella* puede estar presente en todos los segmentos del suministro de agua comunitaria, incluidas las instalaciones de tratamiento. Toda la información científica fue recopilada en el documento de 1985 “*Legionella* Criteria Document” y su versión posterior “*Legionella*. Human Health Criteria Document” de 1999 ⁸⁵. A partir de este documento, fueron publicadas numerosas guías técnicas para la prevención y control de la legionelosis. Algunas guías son muy amplias, mientras que otras tratan de circunstancias específicas, como el control de infecciones dentro de las instalaciones sanitarias o la enfermedad relacionada con los viajes. Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) proporciona información y orientación sobre la evaluación y gestión de riesgos de legionelosis ²⁸⁰. Estos documentos revisan el estado del arte del impacto de *Legionella* en la salud y proporcionan una descripción general de la ecología y los procedimientos de laboratorio. Son documentos orientativos que identifican las medidas necesarias para prevenir o controlar adecuadamente *Legionella* y el riesgo de exposición en cada entorno particular. La OMS indica que para prevenir la infección por *Legionella*, la temperatura recomendada para el almacenamiento y distribución de agua fría debe estar por debajo de 25 °C e idealmente por debajo de 20 °C. Para el agua caliente solo sugiere mantener la temperatura domiciliaria, como una medida de control importante para prevenir o minimizar el desarrollo de la bacteria. Actualmente la OMS no brinda información cuantitativa sobre el nivel crítico o límite aceptable de *Legionella*.

El EWGLI elaboró guías técnicas para el control y la prevención de legionelosis para todos los países miembros de la Unión Europea (UE) tanto para instalaciones de agua fría como caliente ⁸⁹. Estas guías se enfocan en tres principios: primero, en la supervisión de los sistemas de agua domésticos y la inspección adecuada de los puntos críticos para detectar problemas rápidamente y limitar posibles infecciones; en segundo lugar, en el mantenimiento de un nivel suficientemente alto de temperatura en el tanque de almacenamiento para evitar el crecimiento de *L. pneumophila*; por último, en adaptar las medidas necesarias para evitar el estancamiento de agua en determinadas partes del sistema.

Las guías del EWGLI proveen información sobre las concentraciones críticas de *L. pneumophila* y las medidas asociadas ⁸⁹. Los valores de las concentraciones críticas se pueden interpretar en forma independiente en cada país de la UE. En 1987, EWGLI estableció un sistema de vigilancia (conocido como EWGLINET desde 2002) con el objetivo de detectar casos de la enfermedad en personas producidas por viajes o estancias en hoteles u otro tipo de residencias de verano.

En los Estados Unidos, hasta el año 2015 solo había directrices, no regulaciones. A partir de ese año, fue solicitado el primer pedido oficial para la detección de *Legionella* en torres de enfriamiento. Luego, en 2016, continuó la solicitud oficial para la investigación de *Legionella* en instalaciones sanitarias. Actualmente, existen numerosas guías y regulaciones elaboradas por distintas agencias gubernamentales y sociedades como los CDC, la Sociedad Americana de Pruebas y Materiales (*American Society for Testing and Materials*, ASTM), la Agencia de protección ambiental (*Environmental Protection Agency*, EPA) y la Sociedad

Americana de Ingenieros en Calefacción y Refrigeración (*American Society of Heating, Refrigerating and Air-Conditioning Engineers, ASHRAE*)^{45, 183, 207, 268}.

En Australia y Nueva Zelanda, existen más de 25 pautas, códigos y regulaciones, pero no siempre están de acuerdo entre sí. En China, existe un código regulatorio para la prevención de legionelosis que establece que la temperatura de todo el sistema de agua caliente debe ser siempre superior a los 60 °C. Otros países, como Singapur, Rusia, Dubai y Sudáfrica, también tienen sus guías y estándares publicados²⁶⁸. Muchos de estos documentos hacen referencia a publicaciones de estudios clínicos y no están necesariamente basados en evidencia. Existe un amplio consenso sobre los factores de riesgo para la proliferación de *Legionella*; sin embargo, la precisión, exactitud y efectividad de las formas de estimar el riesgo y la carga de enfermedad de legionelosis en la práctica fueron evaluados de manera empírica mediante modelos estadísticos validados ocasionalmente^{14, 129, 247}. Si bien todas las guías comparten los mismos principios básicos con respecto a la prevención y control de legionelosis, es necesaria la unificación de criterios técnicos basados en evidencia y regulaciones más claras y uniformes, para facilitar su implementación.

Bibliografía

- ¹ Addiss DG, Davis JP, LaVenture M, Wand PJ, Hutchinson MA, McKinney RM. Community-acquired Legionnaires' disease associated with a cooling tower: evidence for longer-distance transport of *Legionella pneumophila*. *Am J Epidemiol.* 1989; 130: 557-68.

- ² Adeleke A, Fields B, Benson R, Daneshvar M, Purckler J, Ratcliff R, Harrison T, Weyant R, Birtles R, Raoult D, Halablab M. *Legionella drozanskii* sp. nov., *Legionella rowbothamii* sp. nov. and *Legionella fallonii* sp. nov.: three unusual new *Legionella* species. Int J Syst Evol Microbiol. 2001; 51: 1151–60.
- ³ Aguerre L, Martínez C, Cipolla L, Armitano R, Prieto M. Legionellosis in Argentina. Int J Infect Dis. 2018; 73: 150.
- ⁴ Alexandropoulou I, Parasidis T, Konstantinidis T, Panopoulou M, Constantinidis TC. A proactive environmental approach for preventing legionellosis in infants: water sampling and antibiotic resistance monitoring, a 3-years survey program. Healthcare (Basel). 2019; 7: 39.
- ⁵ Alexiou-Daniel S, Stylianakis A, Papoutsi A, Zorbas I, Papa A, Lambropoulos AF, Antoniadis A. Application of polymerase chain reaction for detection of *Legionella pneumophila* in serum samples. Clin Microbiol Infect. 1998; 4:144-8.
- ⁶ Allard KA, Dao J, Sanjeevaiah P, McCoy-Simandle K, Chatfield CH, Crumrine DS, Castignetti D, Cianciotto NP. Purification of legiobactin and importance of this siderophore in lung infection by *Legionella pneumophila*. Infect Immun. 2009; 77: 2887-95.
- ⁷ Almahmoud I, Kay E, Schneider D, Maurin M. Mutational paths towards increased fluoroquinolone resistance in *Legionella pneumophila*. J Antimicrob Chemother. 2009; 64: 284-93.
- ⁸ Alvarez J, Dominguez A, Sabria M, Torner N, Cayla J, Barrabeig I, Sala MR, Godoy P, Camps N, Minguell S. Impact of the *Legionella* urinary antigen test on epidemiological trends in community outbreaks of legionellosis in Catalonia, Spain, 1990–2004. Int J Infect Dis. 2009; 13: 365–70.
- ⁹ Amemura-Maekawa J, Kura F, Chida K, Ohya H, Kanatani J-I, Isobe J, Tanaka S, Nakajima H, Hiratsuka T, Yoshino S, Sakata M, Murai M, Ohnishi M, Working Group for *Legionella* in Japan. *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species isolated from legionellosis patients in Japan between 2008 and 2016. Appl Environ Microbiol. 2018; 84:e00721-18.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

- ¹⁰ Arancibia F, Cortes CP, Valdés M, Cerda J, Hernández A, Soto L, Torres A. Importance of *Legionella pneumophila* in the etiology of severe community-acquired pneumonia in Santiago, Chile. *Chest*. 2014;145: 290-96.
- ¹¹ Arashiro T, Nakamura S, Asami T, Mikuni H, Fujiwara E, Sakamoto S, Miura R, Shionoya Y, Honda R, Furukawa K, Nakamura A, Saito H. SARS-CoV-2 and *Legionella* co-infection in a person returning from a Nile cruise. *J Travel Med*. 2020; 27: taaa053.
- ¹² Arget M, Kosar J, Suen B, Peermohamed S. Successful treatment of legionnaires' disease with tigecycline in an immunocompromised man with a legion of antibiotic allergies. *Cureus*. 2019; 11: e4577.
- ¹³ Avni T, Bieber A, Green H, Steinmetz T, Leibovici L, Paul M. Diagnostic accuracy of PCR alone and compared to urinary antigen testing for detection of *Legionella* spp.: a systematic review. *J Clin Microbiol*. 2016; 54: 401-11.
- ¹⁴ Azuma K, Uchiyama I, Okumura J. Assessing the risk of Legionnaires' disease: the inhalation exposure model and the estimated risk in residential bathrooms. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2013; 65: 1-6.
- ¹⁵ Bailleul E, Magerman K, Mewis A, Peeters V, Rummens JL, Cartuyvels R. False-positive result with BinaxNOW *Legionella* Antigen immunochromatographic (ICT) assay: response to Helbig *et al.* (2001). *J Med Microbiol*. 2004; 53(Pt 2): 173.
- ¹⁶ Balmer O, Tanner M. Prevalence and implications of multiple-strain infections. *Lancet Infect Dis*. 2011;11: 868-78.
- ¹⁷ Banderet F, Blaich A, Soleman E, Gaia V, Osthoff M. Septic arthritis due to *Legionella cincinnatiensis*: case report and review of the literature. *Infection*. 2017; 45: 551-5.
- ¹⁸ Barskey AE, Lackraj D, Tripathi PS, Lee S, Smith J, Edens C. Travel-associated cases of legionnaires' disease in the United States, 2015-2016. *Travel Med Infect Dis*. 2020; 3: 101943.
- ¹⁹ Barton M, McKelvie B, Campigotto A, Mullaney T. Legionellosis following water birth in a hot tub in a Canadian neonate. *CMAJ*. 2017; 189: E1311-3.

- ²⁰ Benitez AJ, Winchell JM. Clinical application of a multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Legionella* species, *Legionella pneumophila*, and *Legionella pneumophila* serogroup 1. J Clin Microbiol. 2013; 51: 348-51.
- ²¹ Benitez AJ, Winchell JM. Rapid detection and typing of pathogenic nonpneumophila *Legionella* spp. Isolates using a multiplex real-time PCR assay. Diagn Microbiol Infect Dis. 2016; 84: 298-303.
- ²² Benson RF, Thacker WL, Fang FC, Kanter B, Mayberry WR, Brenner DJ. *Legionella sainthelensi* serogroup 2 isolated from patients with pneumonia. Res Microbiol. 1990; 141: 453-63.
- ²³ Berjeaud JM, Chevalier S, Schlusshuber M, Portier E, Loiseau C, Aucher W, Lesouhaitier O, Verdon J. *Legionella pneumophila*: the paradox of a highly sensitive opportunistic waterborne pathogen able to persist in the environment. Front Microbiol. 2016; 7: 486.
- ²⁴ Bernander S, Jacobson K, Helbig JH, Lück PC, Lundholm M. A hospital-associated outbreak of Legionnaires' disease caused by *Legionella pneumophila* serogroup 1 is characterized by stable genetic fingerprinting but variable monoclonal antibody patterns. J Clin Microbiol. 2003; 41: 2503-8.
- ²⁵ Bertelli C, Greub G. Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical microbiology. Clin Microbiol Infect. 2013; 19: 803-13.
- ²⁶ Borella P, Guerrieri E, Marchesi I, Bondi M, Messi P. Water ecology of *Legionella* and protozoan: environmental and public health perspectives. Biotechnol Annu Rev. 2005; 11: 355-80.
- ²⁷ Boshuizen HC, Neppelenbroek SE, van Vliet H, Schellekens J, den Boer J, Peeters MF, Conyn-van Spaendonck MAE. Subclinical *Legionella* infection in workers near the source of a large outbreak of Legionnaires disease. J Infect Dis. 2001; 184: 515-8.
- ²⁸ Boss R, Baumgartner A, Kroos S, Blattner M, Fretz R, Moor D. Rapid detection of viable *Legionella pneumophila* in tap water by a qPCR and RT-PCR-based method. J Appl Microbiol. 2018; 125: 1216-25.

- ²⁹ Brenner DJ, Steigerwalt AG, McDade JE. Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family *Legionellaceae*, familia nova. *Ann Intern Med.* 1979; 90: 656-8.
- ³⁰ Brenner DJ. Classification of the legionellae. *Sem Respir Infect* 1987; 2: 190-205.
- ³¹ Brown A, Garrity GM, Vickers RM. *Fluoribacter dumoffii* (Brenner *et al.*) comb. nov. and *Fluoribacter gormanii* (Morris *et al.*) comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1981; 31: 111-5.
- ³² Bruin JP, Ijzerman EP, den Boer JW, Mouton JW, Diederens BM. Wild-type MIC distribution and epidemiological cut-off values in clinical *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012; 72: 103-8.
- ³³ Bruin JP, Koshkolda T, Ijzerman EP, Lück C, Diederens BM, Den Boer JW, Mouton JW. Isolation of ciprofloxacin-resistant *Legionella pneumophila* in a patient with severe pneumonia. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 69: 2869-71.
- ³⁴ Brunkard JM, Ailes E, Roberts VA, Hill V, Hilborn ED, Craun GF, Rajasingham A, Kahler A, Garrison L, Hicks L, Carpenter J, Wade TJ, Beach MJ, Yoder MS, CDC. Surveillance for waterborne disease outbreaks associated with drinking water--United States, 2007--2008. *MMWR Surveill Summ.* 2011; 23: 60: 38-68.
- ³⁵ Bruscia JL. Legionnaire's disease: cardiac manifestations. *Infect Dis Clin North Am.* 2017; 31: 69-80.
- ³⁶ Burillo A, Pedro-Botet ML, Bouza E. Microbiology and epidemiology of Legionnaire's disease. *Infect Dis Clin North Am.* 2017; 31: 7-27.
- ³⁷ Burstein D, Amaro F, Zusman T, Lifshitz Z, Cohen O, Gilbert JA, Pupko T, Shuman HA, Segal G. Genomic analysis of 38 *Legionella* species identifies large and diverse effector repertoires. *Nat Genet.* 2016; 48: 167-75.
- ³⁸ Byrne B, Swanson MS. Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. *Infect Immun.* 1998; 66: 3029-34.
- ³⁹ Carey KL, Newton HJ, Lührmann A, Roy CR. The *Coxiella burnetii* Dot/Icm system delivers a unique repertoire of type IV effectors into host cells and is required for intracellular replication. *PLoS Pathog.* 2011; 7: e1002056.

- ⁴⁰ Carratalà J, Garcia-Vidal C. An update on *Legionella*. *Curr Opin Infect* 2010; 23: 152–7.
- ⁴¹ Casal MJ, Linares Sicilia MJ, Martinez Nebreda J, Solis Cuesta F. Detection of *Legionella pneumophila*-specific antibody by indirect immunofluorescence assay. *Acta Microbiol Hung*. 1992; 39: 55-9.
- ⁴² Caverly LJ, LiPuma JJ. Cystic fibrosis respiratory microbiota: unraveling complexity to inform clinical practice. *Expert Rev Respir Med*. 2018; 12: 857-65.
- ⁴³ Cazalet C, Rusniok C, Brüggemann H, Zidane N, Magnier A, Ma L, Tichit M, Jarraud S, Bouchier C, Vandenesch F, Kunst F, Etienne J, Glaser P, Buchrieser C. Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nat Genet*. 2004; 36: 1165-73.
- ⁴⁴ Centers for Disease Control and Prevention. Legionnaires' disease surveillance summary report, 2016-2017. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; 2018. Disponible en línea: <https://www.cdc.gov/legionella/health-depts/surv-reporting/surveillance-reports.html>.
- ⁴⁵ Centers for Disease Control and Prevention. Procedures for the recovery of *Legionella* from the environment manual. Disponible en línea: <http://www.cdc.gov/legionella/specimen-collect-mgmt/procedures-manual.html>
- ⁴⁶ Chedid MB, Ilha Dde O, Chedid MF, Dalcin PR, Buzzetti M, Jaconi Saraiva P, Griza D, Menna Barreto SS. Community-acquired pneumonia by *Legionella pneumophila* serogroups 1-6 in Brazil. *Respir Med*. 2005; 99: 966-75.
- ⁴⁷ Chee CE, Baddour LM. *Legionella maceachernii* soft tissue infection. *Am J Med Sci*. 2007; 334: 410-3.
- ⁴⁸ Chitasombat MN, Ratchatanawin N, Visessiri Y. Disseminated extrapulmonary *Legionella pneumophila* infection presenting with panniculitis: case report and literature review. *BMC Infect Dis*. 2018; 18: 467.
- ⁴⁹ Cho MC, Kim H, An D, Lee M, Noh SA, Kim MN, Chong YP, Woo JH. Comparison of sputum and nasopharyngeal swab specimens for molecular diagnosis of *Mycoplasma*

- pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, and *Legionella pneumophila*. *Ann Lab Med*. 2012; 32: 133-8.
- ⁵⁰ Cirillo SL, Bermudez LE, El-Etr SH, Duhamel GE, Cirillo JD. *Legionella pneumophila* entry gene *rtxA* is involved in virulence. *Infect Immun*. 2001; 69: 508-17.
- ⁵¹ Clinical and Laboratory Standards Institute. Disponible en línea: <https://clsi.org>
- ⁵² Cloud JL, Carroll KC, Pixton P, Erali M, Hillyard DR. Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. *J Clin Microbiol*. 2000; 38:1709–12.
- ⁵³ Coetzee N, Duggal H, Hawker J, Ibbotson S, Harrison TG, Phin N, Laza-Stanca V, Johnston R, Iqbal Z, Rehman Y, Knapper E, Robinson S, Aigbogun N. An outbreak of Legionnaires' disease associated with a display spa pool in retail premises, Stoke-on-Trent, United Kingdom, July 2012. *Euro Surveill*. 2012; 17: 20271.
- ⁵⁴ Collins S, Jorgensen F, Willis C, Walker J. Real-time PCR to supplement gold-standard culture-based detection of *Legionella* in environmental samples. *J Appl Microbiol*. 2015; 119: 1158-69.
- ⁵⁵ Collins SL, Afshar B, Walker JT, Aird H, Naik F, Parry-Ford F, Phin N, Harrison TG, Chalker VJ, Sorrell S, Cresswell T. Heated birthing pools as a source of Legionnaires' disease. *Epidemiol Infect*. 2016; 144: 796-802.
- ⁵⁶ Comas I, Cancino-Muñoz I, Mariner-Llicer C, Goig GA, Ruiz-Hueso P, Francés-Cuesta C, García-González N, González-Candelas F. Use of next generation sequencing technologies for the diagnosis and epidemiology of infectious diseases. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2020; 38 Suppl 1: 32-8.
- ⁵⁷ Commission Implementing Decision (EU) 2018/945 of 22 June 2018 on the communicable diseases and related special health issues to be covered by epidemiological surveillance as well as relevant case definitions. Decisions originating from the EU2018 No. 945ANNEX IIDivision 3. Division 3.21
- ⁵⁸ Committee Opinion No. 679: Immersion in water during labor and delivery. *Obstet Gynecol*. 2016; 128: e231-6.

- ⁵⁹ Como J, Moffa MA, Bhanot N, Min Z, Cole KS, Kuzyck J, Walsh TL. Potential false-positive urine *Legionella* enzyme immunoassay test results. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019; 38: 1377-82.
- ⁶⁰ Coscollá M, Fernández C, Colomina J, Sánchez-Busó L, González-Candelas F. Mixed infection by *Legionella pneumophila* in outbreak patients. *Int J Med Microbiol*. 2014; 304: 307-13.
- ⁶¹ Coscollá M, González-Candelas F. Direct sequencing of *Legionella pneumophila* from respiratory samples for sequence-based typing analysis. *J Clin Microbiol*. 2009; 47: 2901-5.
- ⁶² Cunha BA, Burillo A, Bouza E. Legionnaires' disease. *Lancet*. 2016; 387: 376–85.
- ⁶³ Currie SL, Beattie TK, Knapp CW, Lindsay DSJ. *Legionella* spp. in UK composts—a potential public health issue? *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20: O224–9.
- ⁶⁴ Darelid J, Löfgren S, Malmvall BE, Olinder-Nielsen MA, Briheim G, Hallander H. *Legionella pneumophila* serogroup 1 antibody kinetics in patients with Legionnaires' disease: implications for serological diagnosis. *Scand J Infect Dis*. 2003; 35: 15-20.
- ⁶⁵ D'Auria G, Jiménez N, Peris-Bondia F, Pelaz C, Latorre A, Moya A. Virulence factor rtx in *Legionella pneumophila*, evidence suggesting it is a modular multifunctional protein. *BMC Genomics*. 2008; 9: 14.
- ⁶⁶ David S, Mentasti M, Parkhill J, Chalker VJ. Low genomic diversity of *Legionella pneumophila* within clinical specimens. *Clin Microbiol Infect*. 2018; 24: 1020.e1-1020.e4.
- ⁶⁷ David S, Rusniok C, Mentasti M, Gomez-Valero L, Harris SR, Lechat P, Lees J, Ginevra C, Glaser P, Ma L, Bouchier C, Underwood A, Jarraud S, Harrison TG, Parkhill J, Buchrieser C. Multiple major disease-associated clones of *Legionella pneumophila* have emerged recently and independently. *Genome Res*. 2016; 26: 1555-64.
- ⁶⁸ Day E, Dear PH, McCaughan F. Digital PCR strategies in the development and analysis of molecular biomarkers for personalized medicine. *Methods*. 2013; 59: 101-7.
- ⁶⁹ D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD. Sampling the antibiotic resistome. *Science*. 2006; 311: 374-7.

- ⁷⁰ Dey R, Ashbolt N. *Legionella* Infection during and after the COVID-19 Pandemic. ACS ES&T Water 2021; 1: 13-4.
- ⁷¹ Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, McCloskey L, Beck JM, Huffnagle GB, Curtis JL. Spatial variation in the healthy human lung microbiome and the adapted island model of lung biogeography. Ann Am Thorac Soc. 2015; 12: 821-30.
- ⁷² Diederer BM, Kluytmans JA, Vandenbroucke-Grauls CM, Peeters MF. Utility of real-time PCR for diagnosis of Legionnaires' disease in routine clinical practice. J Clin Microbiol. 2008; 46: 671-7.
- ⁷³ Diederer BM, Peeters MF. Are oropharyngeal swabs suitable as samples for *Legionella*-specific PCR testing? J Clin Microbiol. 2007; 45: 3482-3.
- ⁷⁴ Dilger T, Melzl H, Gessner A. Rapid and reliable identification of waterborne *Legionella* species by MALDI-TOF mass spectrometry. J Microbiol Methods. 2016; 127: 154-9.
- ⁷⁵ Ditommaso S, Giacomuzzi M, Rivera SR, Raso R, Ferrero P, Zotti CM. Virulence of *Legionella pneumophila* strains isolated from hospital water system and healthcare-associated Legionnaires' disease in Northern Italy between 2004 and 2009. BMC Infect Dis. 2014; 14: 483.
- ⁷⁶ Dominguez JA, Galí N, Pedroso P, Fargas A, Padilla E, Manterola JM, Matas L. Comparison of the Binax *Legionella* urinary antigen enzyme immunoassay (EIA) with the Biotest *Legionella* Urin antigen EIA for detection of *Legionella* antigen in both concentrated and nonconcentrated urine samples. J Clin Microbiol. 1998; 36: 2718-22.
- ⁷⁷ Dooling KL, Toews K-A, Hicks LA, Garrison LE, Bachaus B, Zansky S, Carpenter LR, Schaffner B, Parker E, Petit S. Active bacterial core surveillance for legionellosis — United States, 2011–2013. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2015; 64: 1190-3.
- ⁷⁸ Ducret A, Chabaliere M, Dukan S. Characterization and resuscitation of 'non-culturable' cells of *Legionella pneumophila*. BMC Microbiol. 2014; 14: 3.
- ⁷⁹ Edelstein P, Lück C. *Legionella*. In: Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Funke G, Landry ML, Richter SS, Warnock DW, editores. Manual of Clinical Microbiology. 11th edition, Washington DC, ASM Press, 2015, p. 887-904.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

- ⁸⁰ Edelstein PH, Brenner DJ, Moss CW, Steigerwalt AG, Francis EM, George WL. *Legionella wadsworthii* species nova: A cause of human pneumonia. *Ann Intern Med.* 1982; 97: 809-13.
- ⁸¹ Edelstein PH, Edelstein MA, Shephard LJ, Ward KW, Ratcliff RM. *Legionella steelei* sp. nov., isolated from human respiratory specimens in California, USA, and South Australia. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2012; 62(Pt 8): 1766-71.
- ⁸² Edelstein PH, Roy CR. Legionnaires' disease and Pontiac fever. En: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 8th edition, Vol. 2, Philadelphia, Saunders, 2015, p. 2633–44.
- ⁸³ Edelstein PH. *Legionella jamestowniensis* fatal pneumonia in an immunosuppressed man. *J Infect Chemother.* 2017; 23: 59-61.
- ⁸⁴ Edwards MT, Fry NK, Harrison TG. Clonal population structure of *Legionella pneumophila* inferred from allelic profiling. *Microbiology (Reading).* 2008; 154(Pt 3): 852-64.
- ⁸⁵ Environmental distribution and disease potential of new *Legionella*-like bacteria as a function of environmental variables. (EPA 1999)
<https://cfpub.epa.gov/ncer/abstracts/index.cfm/fuseaction/display.abstractDetail/abstract/1031/report/1999>
- ⁸⁶ European Centre for Disease Prevention and Control. Communicable disease threats. December 2020. Disponible en línea:
<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Communicable-disease-threats-report-19-dec-2020.pdf>
- ⁸⁷ European Centre for Disease Prevention and Control. Stockholm, Sweden: 2019. Legionnaires' disease—Annual Epidemiological Report for 2017. Available online:
<https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/legionnaires-disease-annual-epidemiological-report-2017>.
- ⁸⁸ European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST. Disponible en línea:
https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Legionella_guidance_document_20160909.pdf (Acceso 09-04-2021)

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

- ⁸⁹ European Technical Guidelines 2017: minimising the risk from *Legionella* infections in building water systems. Disponible en línea: https://www.escmid.org/fileadmin/src/media/PDFs/3Research_Projects/ESGLI/ESGLI_European_Technical_Guidelines_for_the_Prevention_Control_and_Investigation_of_Infections_Caused_by_Legionella_species_June_2017.pdf (Acceso 09-04-2021)
- ⁹⁰ Evans GE, Murdoch DR, Anderson TP, Potter HC, George PM, Chambers ST. Contamination of Qiagen DNA extraction kits with *Legionella* DNA. J Clin Microbiol. 2003; 41: 3452-3.
- ⁹¹ Falzone L, Gattuso G, Lombardo C, Lupo G, Grillo CM, Spandidos DA, Libra M, Salmeri M. Droplet digital PCR for the detection and monitoring of *Legionella pneumophila*. Int J Mol Med. 2020; 46: 1777-82.
- ⁹² Farnham A, Alleyne L, Cimini D, Balter S. Legionnaires' disease incidence and risk factors, New York, New York, USA, 2002-2011. Emerg Infect Dis. 2014; 20: 1795-802.
- ⁹³ Feeley JC, Gibson RJ, Gorman GW, Langford NC, Rasheed JK, Mackel DC, Baine WB. Charcoal-yeast extract agar: Primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. J Clin Microbiol. 1979; 10: 437-41.
- ⁹⁴ Fields BS, Benson RF, Besser R. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 506-26.
- ⁹⁵ Fitzhenry R, Weiss D, Cimini D, Balter S, Boyd C, Alleyne L, Stewart R, McIntosh N, Econome A, Lin Y, Rubinstein I, Passaretti T, Kidney A, Lapierre P, Kass D, Varma JK. Legionnaires' disease outbreaks and cooling towers, New York City, New York, USA. Emerg Infect Dis. 2017; 23: 1769-76.
- ⁹⁶ Flendrie M, Jeurissen M, Franssen M, Kwa D, Klaassen C, Vos F. Septic arthritis caused by *Legionella dumoffii* in a patient with systemic lupus erythematosus-like disease. J Clin Microbiol 2011; 49: 746-9.
- ⁹⁷ Fournier PE, Gouriet F, Casalta JP, Lepidi H, Chaudet H, Thuny F, Collart F, Habib G, Raoult D. Blood culture-negative endocarditis: Improving the diagnostic yield using new diagnostic tools. Medicine (Baltimore). 2017; 96: e8392.

- ⁹⁸ Franco-Garcia A, Varughese TA, Lee YJ, Papanicolaou G, Rosenblum MK, Hollmann TJ, Koehne G, Boulad F, Babady NE, Tang YW, Seo SK. Diagnosis of extrapulmonary legionellosis in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients by direct 16S ribosomal ribonucleic acid sequencing and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Open Forum Infect Dis.* 2017; 4: ofx140.
- ⁹⁹ Francois P, Tangomo M, Hibbs J, Bonetti EJ, Boehme CC, Notomi T, Perkins MD, Schrenzel J. Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011; 62: 41–8.
- ¹⁰⁰ Franzin L, Scolfaro C, Cabodi D, Valera M, Tovo PA. *Legionella pneumophila* pneumonia in a newborn after water birth: a new mode of transmission. *Clin Infect Dis.* 2001; 33: e103-4.
- ¹⁰¹ Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, Parkin WE, Beecham HJ, Sharrar RG, Harris J, Mallison GF, Martin SM, McDade JE, Shepard CC, Brachman PS. *Legionnaires'* disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med* 1977; 297: 1189-97.
- ¹⁰² Fritschel E, Sanyal K, Threadgill H, Cervantes D. Fatal legionellosis after water birth, Texas, USA, 2014. *Emerg Infect Dis.* 2015; 21: 130-2.
- ¹⁰³ Fry NK, Warwick S, Saunders NA, Embley TM. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family *Legionellaceae*. *J Gen Microbiol.* 1991; 137:1215–22.
- ¹⁰⁴ Fukuta Y, Yildiz-Aktas IZ, William Pasculle A, Veldkamp PJ. *Legionella micdadei* prosthetic valve endocarditis complicated by brain abscess: case report and review of the literature. *Scand J Infect Dis.* 2012; 44: 414-8.
- ¹⁰⁵ Gaia V, Fry NK, Afshar B, Lück PC, Meugnier H, Etienne J, Peduzzi R, Harrison TG. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 2047-52.
- ¹⁰⁶ Gaia V, Casati S, Tonolla M. Rapid identification of *Legionella* spp. by MALDI-TOF MS based protein mass fingerprinting. *Syst Appl Microbiol* 2011; 34: 40-4.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

- ¹⁰⁷ Galán JE, Lara-Tejero M, Marlovits TC, Wagner S. Bacterial type III secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells. *Annu Rev Microbiol.* 2014; 68: 415-38.
- ¹⁰⁸ Gamage SD, Ross N, Kralovic SM, Simbartl LA, Roselle GA, Berkelman RL, Chamberlain AT. Health after Legionnaires' disease: A description of hospitalizations up to 5 years after *Legionella pneumoniae*. *PLoS One.* 2021; 16: e0245262.
- ¹⁰⁹ García MT, Pelaz C, Giménez MJ, Aguilar L. *In vitro* activities of gemifloxacin versus five quinolones and two macrolides against 271 Spanish isolates of *Legionella pneumophila*: influence of charcoal on susceptibility test results. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44: 2176-8.
- ¹¹⁰ García-Fulgueiras A, Navarro C, Fenoll D, García J, González-Diego P, Jiménez-Buñuales T, Rodríguez M, López R, Pacheco F, Ruiz J, Segovia M, Balandrón B, Pelaz C. Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9: 915-21.
- ¹¹¹ Garcia-Vidal C, Labori M, Viasus D, Simonetti A, Garcia-Somoza D, Dorca J, Gudiol F, Carratalà J. Rainfall Is a risk factor for sporadic cases of *Legionella pneumophila pneumoniae*. *PLoS ONE* 2013; 8: e61036.
- ¹¹² García-Vidal C, Sánchez-Rodríguez I, Simonetti AF, Burgos J, Viasus D, Martín MT, Falco V, Carratalà J. Levofloxacin versus azithromycin for treating *Legionella pneumoniae*: a propensity score analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2017; 23: 653-8.
- ¹¹³ Garrison LE, Kunz JM, Cooley LA, Moore MR, Lucas C, Schrag S, Sarisky J, Whitney CG. Vital signs: deficiencies in environmental control identified in outbreaks of Legionnaires' disease – North America, 2000–2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2016; 65: 576–84.
- ¹¹⁴ Garrity GM, Brown A, Vickers RM. *Tatlockia* and *Fluoribacter*: two new genera of organisms resembling *Legionella pneumophila*. *Int J Syst Bacteriol.* 1980; 30: 609-14.
- ¹¹⁵ George F, Shivaji T, Pinto CS, Serra LAO, Valente J, Albuquerque MJ, Vicêncio PCO, San-Bento A, Diegues P, Nogueira PJ. A large outbreak of Legionnaires' disease in an Industrial town in Portugal. *Rev Port Saúde Pública* 2016; 34: 199–208.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

Código de campo cambiado

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

Código de campo cambiado

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

- ¹¹⁶ Ginevra C, Chastang J, David S, Mentasti M, Yakunin E, Chalker VJ, Chalifa-Caspi V, Valinsky L, Jarraud S, Moran-Gilad J; ESCMID Study Group for *Legionella* Infections (ESGLI). A real-time PCR for specific detection of the *Legionella pneumophila* serogroup 1 ST1 complex. *Clin Microbiol Infect.* 2020; 26: 514.e1-6.
- ¹¹⁷ Ginevra C, Lopez M, Forey F, Reyrolle M, Meugnier H, Vandenesch F, Etienne J, Jarraud S, Molmeret M. Evaluation of a nested-PCR-derived sequence-based typing method applied directly to respiratory samples from patients with Legionnaires' disease. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 981-7.
- ¹¹⁸ Gomez-Valero L, Buchrieser C. Intracellular parasitism, the driving force of evolution of *Legionella pneumophila* and the genus *Legionella*. *Microbes Infect.* 2019; 21: 230-6.
- ¹¹⁹ Gomez-Valero L, Rusniok C, Rolando M, Neou M, Dervins-Ravault D, Demirtas J, Rouy Z, Moore RJ, Chen H, Petty NK, Jarraud S, Etienne J, Steinert M, Heuner K, Gribaldo S, Médigue C, Glöckner G, Hartland EL, Buchrieser C. Comparative analyses of *Legionella* species identifies genetic features of strains causing Legionnaires' disease. *Genome Biol.* 2014; 15: 505.
- ¹²⁰ Gordon M, Yakunin E, Valinsky L, Chalifa-Caspi V, Moran-Gilad J; ESCMID Study Group for *Legionella* Infections. A bioinformatics tool for ensuring the backwards compatibility of *Legionella pneumophila* typing in the genomic era. *Clin Microbiol Infect.* 2017; 23: 306-10.
- ¹²¹ Graham FF, Hales S, White PS, Baker MG. Review global seroprevalence of legionellosis - a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2020; 10: 7337.
- ¹²² Graham FF, White PS, Harte DJ, Kingham SP. Changing epidemiological trends of legionellosis in New Zealand, 1979-2009. *Epidemiol Infect.* 2012; 140: 1481-96.
- ¹²³ Granseth G, Bhattarai R, Sylvester T, Prasai S, Livar E. Notes from the field: two cases of Legionnaires' disease in newborns after water births - Arizona, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2017; 66: 590-1.
- ¹²⁴ Griffith ME, Lindquist DS, Benson RF, Thacker WL, Brenner DJ, Wilkinson HW. First isolation of *Legionella gormanii* from human disease. *J Clin Microbiol.* 1988; 26: 380-1.

- ¹²⁵ Gubler JG, Schorr M, Gaia V, Zbinden R, Altwegg M. Recurrent soft tissue abscesses caused by *Legionella cincinnatiensis*. J Clin Microbiol. 2001; 39:4568-70.
- ¹²⁶ Hall Sedlak R, Jerome KR. The potential advantages of digital PCR for clinical virology diagnostics. Expert Rev Mol Diagn. 2014; 14: 501-7.
- ¹²⁷ Halperin JJ. Nervous system abnormalities and Legionnaire's disease. Infect Dis Clin North Am. 2017; 31: 55-68.
- ¹²⁸ Hamelin FM, Allen LJS, Bokil VA, Gross LJ, Hilker FM, Jeger MJ, Manore CA, Power AG, Rúa MA, Cunniffe NJ. Coinfections by noninteracting pathogens are not independent and require new tests of interaction. PLoS Biol. 2019 3; 17: e3000551.
- ¹²⁹ Hamilton KA, Prussin AJ 2nd, Ahmed W, Haas CN. Outbreaks of Legionnaires' disease and Pontiac fever 2006-2017. Curr Environ Health Rep. 2018; 5: 263-71.
- ¹³⁰ Hampton LM, Garrison L, Kattan J, Brown E, Kozak-Muiznieks NA, Lucas C, Fields B, Fitzpatrick N, Sapien L, Martin-Escobar T, Waterman S, Hicks LA, Alpuche-Aranda C, Lopez-Gatell H. Legionnaires' disease outbreak at a resort in Cozumel, Mexico. Open Forum Infect Dis. 2016; 3: ofw170.
- ¹³¹ Harrison TG, Afshar B, Doshi N, Fry NK, Lee JV. Distribution of *Legionella pneumophila* serogroups, monoclonal antibody subgroups and DNA sequence types in recent clinical and environmental isolates from England and Wales (2000-2008). Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009; 28: 781-91.
- ¹³² Hébert GA. Room temperature storage of *Legionella* cultures. J Clin Microbiol. 1980; 12: 807-9.
- ¹³³ Helbig JH, Bernander S, Castellani Pastoris M, Etienne J, Gaia V, Lauwers S, Lindsay D, Lück PC, Marques T, Mentula S, Peeters MF, Pelaz C, Struelens M, Uldum SA, Wewalka G, Harrison TG. Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2002; 21: 710-6.

- ¹³⁴ Helbig JH, Jacobs E, Lück C. *Legionella pneumophila* urinary antigen subtyping using monoclonal antibodies as a tool for epidemiological investigations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012; 31: 1673-7.
- ¹³⁵ Helbig JH, Kurtz JB, Pastoris MC, Pelaz C, Lück PC. Antigenic lipopolysaccharide components of *Legionella pneumophila* recognized by monoclonal antibodies: possibilities and limitations for division of the species into serogroups. *J Clin Microbiol*. 1997; 35: 2841-5.
- ¹³⁶ Herwaldt LA, Marra AR. *Legionella*: a reemerging pathogen. *Curr Opin Infect Dis*. 2018; 31: 325-33.
- ¹³⁷ Hornei B, Ewig S, Exner M, Tartakovsky I, Lajoie L, Dangendorf F, Surman-Lee S, Fields B. Legionellosis. Chapter 1. In: Bartram J, Chartier Y, Lee JV, Pond K, Surman-Lee S, editors. *Legionella and the prevention of legionellosis*. World Health Organization, 2007. p. 1-27.
- ¹³⁸ Horwitz MA. Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *J Exp Med*. 1983; 158:2108–26.
- ¹³⁹ Htwe TH, Khardori NM. Legionnaire's disease and immunosuppressive drugs. *Infect Dis Clin North Am*. 2017; 31: 29-42.
- ¹⁴⁰ Ibranosyan M, Beraud L, Lemaire H, Ibranosyan M, Beraud L, Lemaire H, Ranc A-G, Ginevra C, Jarraud S, Descours G. The clinical presentation of *Legionella* arthritis reveals the mode of infection and the bacterial species: case report and literature review. *BMC Infect Dis* 2019; 19: 864.
- ¹⁴¹ Isberg RR, O'Connor TJ, Heidtman M. The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nat Rev Microbiol*. 2009; 7: 13-24.
- ¹⁴² Ishimaru N, Suzuki H, Tokuda Y, Takano T. Severe Legionnaires' disease with pneumonia and biopsy-confirmed myocarditis most likely caused by *Legionella pneumophila* serogroup 6. *Intern Med*. 2012; 51:3207-12.
- ¹⁴³ ISO 11731:2017: Water Quality-Enumeration of *Legionella*. International Organization for Standardization; Geneva: 2017. Disponible en línea: <https://www.iso.org/standard/61782.html>.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

- ¹⁴⁴ Ito A, Yamamoto Y, Ishii Y, Okazaki A, Ishiura Y, Kawagishi Y, Takiguchi Y, Kishi K, Taguchi Y, Shinzato T, Okochi Y, Hayashi R, Nakamori Y, Kichikawa Y, Murata K, Takeda H, Higa F, Miyara T, Saito K, Ishikawa T, Ishida T, Tateda K. Evaluation of a novel urinary antigen test kit for diagnosing *Legionella* pneumonia. *Int J Infect Dis.* 2020; 103: 42-7.
- ¹⁴⁵ Jaber L, Amro M, Tair HA, Bahader SA, Alalam H, Butmeh S, Hilal DA, Brettar I, Höfle MG, Bitar DM. Comparison of in situ sequence type analysis of *Legionella pneumophila* in respiratory tract secretions and environmental samples of a hospital in East Jerusalem. *Epidemiol Infect.* 2018; 146: 2116-21.
- ¹⁴⁶ Jarraud S, Descours G, Ginevra C, Lina G, Etienne J. Identification of *Legionella* in clinical samples. *Methods Mol Biol.* 2013; 954: 27-56.
- ¹⁴⁷ Jaulhac B, Nowicki M, Bornstein N, Meunier O, Prevost G, Piemont Y, Fleurette J, Monteil H. Detection of *Legionella* spp. in bronchoalveolar lavage fluids by DNA amplification. *J Clin Microbiol.* 1992; 30: 920-4.
- ¹⁴⁸ Jiang L, Amemura-Maekawa J, Ren H, Li Y, Sakata M, Zhou H, Murai M, Chang B, Ohnishi M, Qin T. Distribution of *lag-1* alleles, *ORF7*, and *ORF8* genes of lipopolysaccharide and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates in Japan and China. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019; 9:274.
- ¹⁴⁹ Jodra Sánchez S, Barrueco Ferrero M. Neumonía por *Legionella*, ¿cuándo solicitar la antigenuria en orina? *Med Clin (Barc).* 2016; 146: 394-6.
- ¹⁵⁰ Johnson ES. Legionellosis. En: Chrétien F, Wong KT, Sharer LR, Keohane C, Gray F, editores. *Infections of the central nervous system: pathology and genetics.* Wiley Online Library, 2020, Chapter 40, p. 383-91.
- ¹⁵¹ Joly JR, McKinney RM, Tobin JO, Bibb WF, Watkins ID, Ramsay D. Development of a standardized subgrouping scheme for *Legionella pneumophila* serogroup 1 using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol.* 1986; 23: 768-71.
- ¹⁵² Jomehzadeh N, Moosavian M, Saki M, Rashno M. *Legionella* and Legionnaires' disease: an overview. *J Acute Des.* 2019; 8: 221-32

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

- ¹⁵³ Kallings I, Nordström K. The pattern of immunoglobulins with special reference to IgM in Legionnaires' disease patients during a 2-year follow-up period. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*. 1983; 255: 27-32.
- ¹⁵⁴ Khayat R, Abdullah N, Biswas S, Rehman H, Short K. Epidemiological trends of reported Legionnaires' disease in Houston, Texas, 2014-2017. *Online J Public Health Inform*. 2019; 11: e383.
- ¹⁵⁵ Khodr A, Kay E, Gomez-Valero L, Ginevra C, Doublet P, Buchrieser C, Jarraud S. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Legionella*. *Infect Genet Evol*. 2016; 43:108-22.
- ¹⁵⁶ King A. Recommendations for susceptibility tests on fastidious organisms and those requiring special handling. *J Antimicrob Chemother*. 2001; 48 (Suppl 1): 77-80.
- ¹⁵⁷ Kirschner AKT. Determination of viable legionellae in engineered water systems: do we find what we are looking for? *Water Res*. 2016; 93: 276-88.
- ¹⁵⁸ Knirsch CA, Jakob K, Schoonmaker D, Kiehlbauch JA, Wong SJ, Della-Latta P, Whittier S, Layton M, Scully B. An outbreak of *Legionella micdadei* pneumonia in transplant patients: evaluation, molecular epidemiology, and control. *Am J Med* 2000; 108: 290–95.
- ¹⁵⁹ Kozak NA, Benson RF, Brown E, Alexander NT, Taylor TH Jr, Shelton BG, Fields BS. Distribution of *lag-1* alleles and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical and environmental isolates in the United States. *J Clin Microbiol*. 2009; 47: 2525-35.
- ¹⁶⁰ Kozak-Muiznieks NA, Morrison SS, Mercante JW, Ishaq MK, Johnson T, Caravas J, Lucas CE, Brown E, Raphael BH, Winchell JM. Comparative genome analysis reveals a complex population structure of *Legionella pneumophila* subspecies. *Infect Genet Evol*. 2018; 59: 172-85.
- ¹⁶¹ Kyritsi MA, Kristo I, Hadjichristodoulou C. Serotyping and detection of pathogenicity loci of environmental isolates of *Legionella pneumophila* using MALDI-TOF MS. *Int J Hyg Environ Health*. 2020; 224: 113441.

- ¹⁶² La Scola B, Birtles RJ, Greub G, Harrison TJ, Ratcliff RM, Raoult D. *Legionella drancourtii* sp. nov., a strictly intracellular amoebal pathogen. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004; 54: 699–703.
- ¹⁶³ La Scola B, Mezi L, Weiller PJ, Raoult D. Isolation of *Legionella anisa* using an amoebic coculture procedure. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 365-6.
- ¹⁶⁴ Lerolle N, Zahar JR, Duboc V, Tissier F, Rabbat A. Pneumonia involving *Legionella pneumophila* and *Listeria monocytogenes* in an immunocompromised patient: an unusual coinfection. *Respiration.* 2002; 69: 359-61.
- ¹⁶⁵ Lettinga KD, Verbon A, Nieuwkerk PT, Jonkers RE, Gersons BP, Prins JM, Speelman P. Health-related quality of life and posttraumatic stress disorder among survivors of an outbreak of Legionnaires disease. *Clin Infect Dis.* 2002; 35: 11-7.
- ¹⁶⁶ Li Y, Fan P, Zhou S, Zhang L. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a novel rapid detection platform for pathogens. *Microb Pathog.* 2017; 107: 54-61.
- ¹⁶⁷ Liles MR, Scheel TA, Cianciotto NP. Discovery of a nonclassical siderophore, legiobactin, produced by strains of *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol.* 2000; 182: 749-57.
- ¹⁶⁸ Lindsay DSJ, Brown AW, Brown DJ, Pravinkumar SJ, Anderson E, Edwards GFS. *Legionella longbeachae* serogroup 1 infections linked to potting compost. *J Med Microbiol.* 2012; 61: 218-22.
- ¹⁶⁹ Littrup P, Madsen JK, Lind K. Aortic valve endocarditis associated with *Legionella* infection after *Mycoplasma pneumoniae*. *Heart.* 1987; 58: 293-5.
- ¹⁷⁰ Lo Presti F, Riffard S, Vandenesch F, Reyrolle M, Ronco E, Ichai P, Etienne J. The first clinical isolate of *Legionella parisiensis*, from a liver transplant patient with pneumonia. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 1706-9.
- ¹⁷¹ Loeb M, Simor AE, Mandell L, Krueger P, McArthur M, James M, Walter S, Richardson E, Lingley M, Stout J, Stronach D, McGeer A. Two nursing home outbreaks of respiratory infection with *Legionella sainthelensi*. *J Am Geriatr Soc* 1999; 47: 547-52.
- ¹⁷² Lu X, Mo ZY, Zhao HB, Yan H, Shi L. LAMP-based method for a rapid identification of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011; 92: 179-87.

- ¹⁷³ Lüch C, Fry NK, Helbig JH, Jarraud S, Harrison TG. Typing methods for *Legionella*. *Methods Mol Biol.* 2013; 954: 119-48.
- ¹⁷⁴ Luna CM, Famiglietti A, Absi R, Videla AJ, Nogueira FJ, Fuenzalida AD, Gené RJ. Community-acquired pneumonia: etiology, epidemiology, and outcome at a teaching hospital in Argentina. *Chest.* 2000; 118: 1344 - 54
- ¹⁷⁵ Maiden MC, Jansen van Rensburg MJ, Bray JE, Earle SG, Ford SA, Jolley KA, McCarthy ND. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat Rev Microbiol.* 2013; 11: 728-36.
- ¹⁷⁶ Martínez-Girón R, Esteban JG, Ribas A, Doganci L. Protozoa in respiratory pathology: a review. *Eur Respir J.* 2008; 32: 1354-70.
- ¹⁷⁷ Matsiota-Bernard P, Waser S, Vrioni G. Detection of *Legionella pneumophila* DNA in urine and serum samples from patients with pneumonia. *Clin Microbiol Infect.* 2000 ;6: 223-5.
- ¹⁷⁸ Matsui M, Fujii S, Shiroiwa R, Amemura-Maekawa J, Chang B, Kura F, Yamauchi K. Isolation of *Legionella rubrilucens* from a pneumonia patient co-infected with *Legionella pneumophila*. *J Med Microbiol* 2010; 59:1242-6.
- ¹⁷⁹ McAdam PR, Vander Broek CW, Lindsay DS, Ward MJ, Hanson MF, Gillies M, Watson M, Stevens JM, Edwards GF, Fitzgerald JR. Gene flow in environmental *Legionella pneumophila* leads to genetic and pathogenic heterogeneity within a Legionnaires' disease outbreak. *Genome Biol.* 2014; 15: 504.
- ¹⁸⁰ Mcdade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus MA, Dowdle WR. Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med.* 1977; 297: 1197-203.
- ¹⁸¹ Mérault N, Rusniok C, Jarraud S, Gomez-Valero L, Cazalet C, Marin M, Brachet E, Aegerter P, Gaillard JL, Etienne J, Herrmann JL; DELPH-I Study Group, Lawrence C, Buchrieser C. Specific real-time PCR for simultaneous detection and identification of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in water and clinical samples. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77: 1708-17.

- ¹⁸² Mercante JW, Caravas JA, Ishaq MK, Kozak-Muiznieks NA, Raphael BH, Winchell JM. Genomic heterogeneity differentiates clinical and environmental subgroups of *Legionella pneumophila* sequence type 1. PLoS One. 2018; 13:e0206110.
- ¹⁸³ Mercante JW, Winchell JM. Current and emerging *Legionella* diagnostics for laboratory and outbreak investigations. Clin Microbiol Rev. 2015; 28: 95–133.
- ¹⁸⁴ Misch EA. *Legionella*: virulence factors and host response. Curr Opin Infect Dis. 2016; 29: 280-6.
- ¹⁸⁵ Mitchell DH, Hicks LJ, Chiew R, Montanaro JC, Chen SC. Pseudoepidemic of *Legionella pneumophila* serogroup 6 associated with contaminated bronchoscopes. J Hosp Infect. 1997; 37: 19-23.
- ¹⁸⁶ Mizrahi H, Peretz A, Lesnik R, Aizenberg-Gershtein Y, Rodríguez-Martínez S, Sharaby Y, Pastukh N, Brettar I, Höfle MG, Halpern M. Comparison of sputum microbiome of legionellosis-associated patients and other pneumonia patients: indications for polybacterial infections. Sci Rep. 2017; 7: 40114.
- ¹⁸⁷ Moliner C, Ginevra C, Jarraud S, Flaudrops C, Bedotto M, Couderc C, Etienne J, Fournier PE. Rapid identification of *Legionella* species by mass spectrometry. J Med Microbiol. 2010; 59: 273-84.
- ¹⁸⁸ Mondino S, Schmidt S, Rolando M, Escoll P, Gomez-Valero L, Buchrieser C. Legionnaires' disease: state of the art knowledge of pathogenesis mechanisms of *Legionella*. Annu Rev Pathol Mech Dis. 2020; 15: 439-66.
- ¹⁸⁹ Moosavian M, Seyed-Mohammadi S, Saki M, Shahi F, Sima MK, Afshar D, Barati S. Loop-mediated isothermal amplification for detection of *Legionella pneumophila* in respiratory specimens of hospitalized patients in Ahvaz, southwest Iran. Infect Drug Resist. 2019; 12:529-34.
- ¹⁹⁰ Moran-Gilad J, Lazarovitch T, Mentasti M, Harrison T, Weinberger M, Mordish Y, Mor Z, Stocki T, Anis E, Sadik C, Amitai Z, Grotto I. Humidifier-associated paediatric Legionnaires' disease, Israel, February 2012. Euro Surveill. 2012; 17: 20293.

- ¹⁹¹ Moran-Gilad J, Prior K, Yakunin E, Harrison TG, Underwood A, Lazarovitch T, Valinsky L, Luck C, Krux F, Agmon V, Grotto I, Harmsen D. Design and application of a core genome multilocus sequence typing scheme for investigation of Legionnaires' disease incidents. *Euro Surveill.* 2015; 20: 21186.
- ¹⁹² Motro Y, Moran-Gilad J. Microbial metagenomics mock scenario-based sample simulation (M3S3). *Clin Microbiol Infect.* 2018; 24: 308.e1-4.
- ¹⁹³ Mouchtouri VA, Goutziana G, Kremastinou J, Hadjichristodoulou C. *Legionella* species colonization in cooling towers: Risk factors and assessment of control measures. *Am J Infect Control* 2010; 38: 50-5.
- ¹⁹⁴ Muder RR, Yu VL. Infection due to *Legionella* species other than *L. pneumophila*. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 990-95.
- ¹⁹⁵ Murdoch DR. Diagnosis of *Legionella* infection. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 64–9.
- ¹⁹⁶ Musallam N, Bamberger E, Srugo I, Dabbah H, Glikman D, Zonis Z, Kessel A, Genizi J. *Legionella pneumophila* and *Pneumocystis jirovecii* coinfection in an infant treated with adrenocorticotrophic hormone for infantile spasm: case report and literature review. *J Child Neurol.* 2014; 29: 240-2.
- ¹⁹⁷ Muyldermans A, Descheemaeker P, Boel A, Desmet S, Van Gasse N, Reynders M; National Expert Committee on Infectious Serology. What is the risk of missing legionellosis relying on urinary antigen testing solely? A retrospective Belgian multicenter study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020; 39: 729-34.
- ¹⁹⁸ NCDHHS final report on 2019 Legionnaires' disease outbreak in Western North Carolina. <https://www.ncdhhs.gov/news/press-releases/ncdhhs-releases-final-report-2019-legionnaires%E2%80%99-disease-outbreak-western-north>.
- ¹⁹⁹ Neild AL, Roy CR. Immunity to vacuolar pathogens: what can we learn from *Legionella*? *Cell Microbiol.* 2004; 6: 1011-8.
- ²⁰⁰ Newton HJ, Ang DK, van Driel IR, Hartland EL. Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. *Clin Microbiol Rev.* 2010; 23: 274-98.

- ²⁰¹ Newton HJ, Hartland EL, Machner MP. Biology and pathogenesis of *Legionella*. Front Cell Infect Microbiol. 2018 Sep 19; 8: 328.
- ²⁰² Nguyen TM, Ille D, Jarraud S, Rouil L, Campese C, Che D, Haeghebaert S, Ganiayre F, Marcel F, Etienne J, Desenclos JC. A community-wide outbreak of Legionnaires disease linked to industrial cooling towers--how far can contaminated aerosols spread? J Infect Dis. 2006; 193: 102-11.
- ²⁰³ Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 2000; 28: E63.
- ²⁰⁴ Orrison LH, Cherry WB, Tyndall RL, Fliermans CB, Gough SB, Lambert MA, McDougal LK, Bibb WF, Brenner DJ. *Legionella oakridgensis*: Unusual new species isolated from cooling tower water. Appl Environ Microbiol. 1983; 45: 536-45.
- ²⁰⁵ Padmos LJ, Blair JE, Kusne S, DiCauda DJ, Mikhael JR. Cutaneous legionellosis: case report and review of the medical literature. Transpl Infect Dis. 2014; 16: 307-14.
- ²⁰⁶ Pappa O, Chochlakis D, Sandalakis V, Dioli C, Psaroulaki A, Mavridou A. Antibiotic resistance of *Legionella pneumophila* in clinical and water Isolates-a systematic review. Int J Environ Res Public Health. 2020; 17: 5809.
- ²⁰⁷ Parr A, Whitney EA, Berkelman RL. Legionellosis on the rise: a review of guidelines for prevention in the United States. J Public Health Manag Pract. 2015; 21: E17-26.
- ²⁰⁸ Pascale MR, Mazzotta M, Salaris S, Girolamini L, Grottola A, Simone ML, Cordovana M, Bisognin F, Dal Monte P, Bucci Sabattini MA, Viggiani M, Cristino S. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry in diagnostic and environmental species: a comparison with culture and *mip*-gene sequencing technique. Front Microbiol. 2020; 11: 589369.
- ²⁰⁹ Peabody MA, Caravas JA, Morrison SS, Mercante JW, Prystajacky NA, Raphael BH, Brinkman FSL. Characterization of *Legionella* species from watersheds in British Columbia, Canada. mSphere. 2017; 2: e00246-17.
- ²¹⁰ Pearce MM, Theodoropoulos N, Mandel MJ, Brown E, Reed KD, Cianciotto NP. *Legionella cardiaca* sp. nov., isolated from a case of native valve endocarditis in a human heart. Int J Syst Evol Microbiol. 2012; 62: 2946-54.

Con formato: Español (Argentina)

- ²¹¹ Peci A, Winter AL, Gubbay JB. Evaluation and comparison of multiple test methods, including real-time PCR, for *Legionella* detection in clinical specimens. *Front Public Health*. 2016; 4: 175.
- ²¹² Pérez-Cobas AE, Ginevra C, Rusniok C, Jarraud S, Buchrieser C. Persistent Legionnaires' disease and associated antibiotic treatment engender a highly disturbed pulmonary microbiome enriched in opportunistic microorganisms. *mBio*. 2020; 11: e00889-20.
- ²¹³ Petzold M, Prior K, Moran-Gilad J, Harmsen D, Lück C. Epidemiological information is key when interpreting whole genome sequence data - lessons learned from a large *Legionella pneumophila* outbreak in Warstein, Germany, 2013. *Euro Surveill*. 2017; 22: 17-00137.
- ²¹⁴ Phares CR, Wangroongsarb P, Chantra S, Paveenkitiporn W, Tondella ML, Benson RF, Thacker WL, Fields BS, Moore MR, Fischer J, Dowell SF, Olsen SJ. Epidemiology of severe pneumonia caused by *Legionella longbeachae*, *Mycoplasma pneumoniae*, and *Chlamydia pneumoniae*: 1-year, population-based surveillance for severe pneumonia in Thailand. *Clin Infect Dis*. 2007; 45: e147-55.
- ²¹⁵ Phin N, Parry-Ford F, Harrison T, Stagg HR, Zhang N, Kumar K, Lortholary O, Zumla A, Abubakar I. Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. *Lancet Infect Dis*. 2014; 14: 1011-21.
- ²¹⁶ Pierre DM, Baron J, Yu VL, Stout JE. Diagnostic testing for Legionnaires' disease. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2017; 16: 59.
- ²¹⁷ Poole S, Clark TW. Rapid syndromic molecular testing in pneumonia: the current landscape and future potential. *J Infect*. 2020; 80: 1-7.
- ²¹⁸ Prichard W, Fick L. When diarrhea can become deadly: Legionnaires' disease complicated by bowel obstruction. *Case Rep Gastroenterol*. 2016; 10: 781-6.
- ²¹⁹ Priest PC, Slow S, Chambers ST, Cameron CM, Balm MN, Beale MW, Blackmore TK, Burns AD, Drinković D, Elvy JA, Everts RJ, Hammer DA, Huggan PJ, Mansell CJ, Raeder VM, Roberts SA, Robinson MC, Sathyendran V, Taylor SL, Thompson AW, Ussher JE, van der Linden AJ, Williams MJ, Podmore RG, Anderson TP, Barratt K, Mitchell JL, Harte DJ,

- Hope VT, Murdoch DR. The burden of Legionnaires' disease in New Zealand (LegiNZ): a national surveillance study. *Lancet Infect Dis*. 2019; 19: 770-7.
- ²²⁰ Principe L, Tomao P, Visca P. Legionellosis in the occupational setting. *Environ Res*. 2017. 152: 485-95.
- ²²¹ Prussin AJ, Schwake DO, Marr LC. Ten questions concerning the aerosolization and transmission of *Legionella* in the built environment. *Build Environ*. 2017; 123: 684-95.
- ²²² Qin T, Zhang W, Liu W, Zhou H, Ren H, Shao Z, Lan R, Xu J. Population structure and minimum core genome typing of *Legionella pneumophila*. *Sci Rep*. 2016; 6 :21356.
- ²²³ Qiu J, Luo ZQ. *Legionella* and *Coxiella* effectors: strength in diversity and activity. *Nat Rev Microbiol*. 2017; 15:591-605.
- ²²⁴ Quero S, Párraga-Niño N, Sabria M, Barrabeig I, Sala MR, Jané M, Mateu L, Sopena N, Pedro-Botet ML, Garcia-Nuñez M. *Legionella* SBT applied directly to respiratory samples as a rapid molecular epidemiological tool. *Sci Rep*. 2019; 9: 623.
- ²²⁵ Rantakokko-Jalava K, Jalava J. Development of conventional and real-time PCR assays for detection of *Legionella* DNA in respiratory specimens. *J Clin Microbiol*. 2001; 39: 2904-10.
- ²²⁶ Raphael BH, Baker DJ, Nazarian E, Lapierre P, Bopp D, Kozak-Muiznieks NA, Morrison SS, Lucas CE, Mercante JW, Musser KA, Winchell JM. Genomic resolution of outbreak-associated *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from New York State. *Appl Environ Microbiol*. 2016; 82: 3582-90.
- ²²⁷ Ratcliff RM, Lanser JA, Manning PA, Heuzenroeder MW. Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the *mip* gene. *J Clin Microbiol*. 1998; 36: 1560-7.
- ²²⁸ Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Lück PC. Addition of *neuA*, the gene encoding N-acetylneuraminate cytidyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J Clin Microbiol*. 2007; 45: 1965-8.
- ²²⁹ Regan CM, Syed Q, Mutton K, Wiratunga B. A pseudo community outbreak of legionnaires' disease on Merseyside; implications for investigation of suspected clusters. *J Epidemiol Community Health*. 2000; 54: 766-9.

- ²³⁰ Reuter C, Slesiona N, Hentschel S, Aehlig O, Breitenstein A, Csáki A, Henkel T, Fritzsche W. Loop-mediated amplification as promising on-site detection approach for *Legionella pneumophila* and *Legionella* spp. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020; 104: 405-15.
- ²³¹ Reuter S, Harrison TG, Köser CU, Ellington MJ, Smith GP, Parkhill J, Peacock SJ, Bentley SD, Török ME. A pilot study of rapid whole-genome sequencing for the investigation of a *Legionella* outbreak. *BMJ Open.* 2013; 3: e002175.
- ²³² Rizzo C, Caporali MG, Rota MC. Pandemic influenza and pneumonia due to *Legionella pneumophila*: a frequently underestimated coinfection. *Clin Infect Dis.* 2010; 51: 115.
- ²³³ Rota MC, Fontana S, Montaña-Remacha C, Scaturro M, Caporali MG, Vullo V, Scorzoloni L, Ercole A, Ricci ML. Legionnaires' disease pseudoepidemic due to falsely positive urine antigen test results. *J Clin Microbiol.* 2014; 52: 2279-80.
- ²³⁴ Rowbotham TJ. Legionella-like amoebal pathogens. En: Barbaree JM, Breiman, F. R, Dufour AP, editores. *Legionella: Current status and emerging perspectives.* Washington DC, American Society for Microbiology, 1993, p.137-140.
- ²³⁵ Rowbotham TJ. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol.* 1980; 33: 1179-83.
- ²³⁶ Saladi L, Zaidi B, Toolsie O, Vakde T, Adrish M. A case report of *Legionella* and *Mycoplasma pneumoniae*: Co-incidence or co-infection? *Medicine (Baltimore).* 2018; 97: e12650.
- ²³⁷ Sanchez M, Sebti R, Hassoun P, Mannion C. Goy A, Feldman T, Mato A, Hong T. Osteomyelitis of the patella caused by *Legionella anisa*. *J Clin Microbiol.* 2013; 51: 2791-3.
- ²³⁸ Sánchez-Parra B, Núñez A, Moreno DA. Preventing legionellosis outbreaks by a quick detection of airborne *Legionella pneumophila*. *Environ Res.* 2019; 171: 546-9.
- ²³⁹ Sanganyado E, Gwenzi W. Antibiotic resistance in drinking water systems: Occurrence, removal, and human health risks. *Sci Total Environ.* 2019; 669: 785-97.
- ²⁴⁰ Schalk JAC, van Leeuwen AED, Lodder WJ, de Man H, Euser S, den Boer J, de Roda Husmana A. Isolation of *Legionella pneumophila* from pluvial floods by amoebal coculture. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78: 4519–21.

- ²⁴¹ Schuetz AN, Hughes RL, Howard RM, Williams TC, Nolte FS, Jackson D, Ribner BS. Pseudo-outbreak of *Legionella pneumophila* serogroup 8 infection associated with a contaminated ice machine in a bronchoscopy suite. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2009; 30: 461-6.
- ²⁴² Schulze-Röbbecke R. A pseudo-outbreak of Legionnaires' disease in an acute-care hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2020; 41: 256-7.
- ²⁴³ Selander RK, McKinney RM, Whittam TS, Bibb WF, Brenner DJ, Nolte FS, Pattison PE. Genetic structure of populations of *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol.* 1985; 163: 1021-37.
- ²⁴⁴ Shachor-Meyouhas Y, Kassis I, Bamberger E, Nativ T, Sprecher H, Levy I, Srugo I. Fatal hospital-acquired *Legionella* pneumonia in a neonate. *Pediatr Infect Dis J.* 2010; 29: 280-1.
- ²⁴⁵ Shadoud L, Almahmoud I, Jarraud S, Etienne J, Larrat S, Schwebel C, Timsit JF, Schneider D, Maurin M. Hidden selection of bacterial resistance to fluoroquinolones *in vivo*: the case of *Legionella pneumophila* and humans. *EBioMedicine.* 2015; 2: 1179-85.
- ²⁴⁶ Shakeshaft MK, Murdoch DR. Microscopic screening of sputum samples should not be used when testing for *Legionella* species. *Clin Infect Dis.* 2020; 71: 1356-7.
- ²⁴⁷ Sharaby Y, Nitzan O, Brettar I, Höfle MG, Peretz A, Halpern M. Antimicrobial agent susceptibilities of *Legionella pneumophila* MLVA-8 genotypes. *Sci Rep.* 2019; 9: 6138.
- ²⁴⁸ Sheehan KB, Henson JM, Ferris MJ. *Legionella* species diversity in an acidic biofilm community in Yellowstone National Park. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71: 507–11
- ²⁴⁹ Shen H, Rogelj S, Kieft TL. Sensitive, real-time PCR detects low-levels of contamination by *Legionella pneumophila* in commercial reagents. *Mol Cell Probes.* 2006; 20: 147-53.
- ²⁵⁰ Shimada T, Noguchi Y, Jackson JL, Miyashita J, Hayashino Y, Kamiya T, Yamazaki S, Matsumura T, Fukuhara S. Systematic review and meta-analysis: urinary antigen tests for legionellosis. *Chest.* 2009; 136: 1576–85.
- ²⁵¹ Sivagnanam S, Podczervinski S, Butler-Wu SM, Hawkins V, Stednick Z, Helbert LA, Glover WA, Whimbey E, Duchin J, Cheng G-S, Pergam SA. Legionnaires' disease in transplant

- recipients: a 15-year retrospective study in a tertiary referral center. *Transpl Infect Dis* 2017; 19 (5).
- ²⁵² Starnbach MN, Falkow S, Tompkins LS. Species-specific detection of *Legionella pneumophila* in water by DNA amplification and hybridization. *J Clin Microbiol.* 1989; 27: 1257-61.
- ²⁵³ Stølhaug A, Bergh K. Identification and differentiation of *Legionella pneumophila* and *Legionella* spp. with real-time PCR targeting the *16S rRNA* gene and species identification by *mip* sequencing. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72: 6394–8.
- ²⁵⁴ Stout JE, Yu VL. Legionellosis. *N Engl J Med.* 1997; 337: 682-7.
- ²⁵⁵ Ta AC, Stout JE, Yu VL, Wagener MM. Comparison of culture methods for monitoring *Legionella* species in hospital potable water systems and recommendations for standardization of such methods. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 2118-23.
- ²⁵⁶ Tan MJ, Tan JS, File TM Jr. Legionnaires disease with bacteremic coinfection. *Clin Infect Dis.* 2002; 35: 533-9.
- ²⁵⁷ Tay, ST, Lakhbeer Singh H, Ramasame SD, Vadivelu J. Detection of IgM antibodies against *Legionella pneumophila* serogroup 1 in Malaysian blood donors and patients with respiratory illnesses: evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay. *Jpn J Infect Dis.* 2009; 62: 409–10.
- ²⁵⁸ Taylor MJ, Bentham RH, Ross KE. Limitations of using propidium monoazide with qPCR to discriminate between live and dead *Legionella* in biofilm samples. *Microbiol Insights.* 2014; 7: 15-24.
- ²⁵⁹ Thacker WL, Benson RF, Schifman RB, Pugh E, Steigerwalt AG, Mayberry WR, Brenner DJ, Wilkinson HW. *Legionella tucsonensis* sp. nov. isolated from a renal transplant recipient. *J Clin Microbiol.* 1989; 27: 1831-4.
- ²⁶⁰ Thacker WL, Benson RF, Staneck JL, Vincent SR, Mayberry WR, Brenner DJ, Wilkinson HW. *Legionella cincinnatiensis* sp. nov. isolated from a patient with pneumonia. *J Clin Microbiol.* 1988; 26: 418-20.

²⁶¹ Thacker WL, Dyke JW, Benson RF, Havlichek DH Jr, Robinson-Dunn B, Stiefel H, Schneider W, Moss CW, Mayberry WR, Brenner DJ. *Legionella lansingensis* sp. nov. isolated from a patient with pneumonia and underlying chronic lymphocytic leukemia. J Clin Microbiol. 1992; 30: 2398-401.

²⁶² Thornley CN, Harte DJ, Weir RP, Allen LJ, Knightbridge KJ, Wood PRT. *Legionella longbeachae* detected in an industrial cooling tower linked to a legionellosis outbreak, New Zealand, 2015; possible waterborne transmission? Epidemiol Infect 2017; 145: 2382.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

²⁶³ Torres A, Peetermans WE, Viegı G, Blasi F. Risk factors for community-acquired pneumonia in adults in Europe: a literature review. Thorax. 2013; 68: 1057-65.

²⁶⁴ Trnková K, Kotrbancová M, Špaleková M, Fulová M, Boledovičová J, Vesteg M. MALDI-TOF MS analysis as a useful tool for an identification of *Legionella pneumophila*, a facultatively pathogenic bacterium interacting with free-living amoebae: a case study from water supply system of hospitals in Bratislava (Slovakia). Exp Parasitol. 2018; 184: 97-102.

²⁶⁵ Vaccaro L, Izquierdo F, Magnet A, Hurtado C, Salinas MB, Gomes TS, Angulo S, Salso S, Pelaez J, Tejada MI, Alhambra A, Gómez C, Enríquez A, Estirado E, Fenoy S, Del Aguila C. First case of legionnaire's disease caused by *Legionella anisa* in Spain and the limitations on the diagnosis of *Legionella* non-pneumophila infections. PLoS One. 2016; 11: e0159726.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

²⁶⁶ van der Mee-Marquet N, Domelier AS, Arnault L, Bloc D, Laudat P, Hartemann P, Quentin R. *Legionella anisa*, a possible indicator of water contamination by *Legionella pneumophila*. J Clin Microbiol 2006; 44: 56-9.

²⁶⁷ van der Zee A, Peeters M, de Jong C, Verbakel H, Crielaard JW, Claas EC, Templeton KE. Qiagen DNA extraction kits for sample preparation for *Legionella* PCR are not suitable for diagnostic purposes. J Clin Microbiol. 2002; 40: 1126.

²⁶⁸ Van Kenhove E, Dinne K, Janssens A, Laverge J. Overview and comparison of *Legionella* regulations worldwide. Am J Infect Control. 2019; 47: 968-78.

²⁶⁹ Vandewalle-Capo M, Massip C, Descours G, Charavit J, Chastang J, Billy PA, Boisset S, Lina G, Gilbert C, Maurin M, Jarraud S, Ginevra C. Minimum inhibitory concentration (MIC)

- distribution among wild-type strains of *Legionella pneumophila* identifies a subpopulation with reduced susceptibility to macrolides owing to efflux pump genes. *Int J Antimicrob Agents*. 2017; 50: 684-9.
- ²⁷⁰ Vickers RM, Rihs JD, Yu VL. Clinical demonstration of isolation of *Nocardia asteroides* on buffered charcoal-yeast extract media [published correction appears in *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1905]. *J Clin Microbiol*. 1992; 30: 227-8.
- ²⁷¹ Vinh DC, Garceau R, Martinez G, Wiebe D, Burdz T, Reimer A, Bernard K. *Legionella jordanis* lower respiratory tract infection: case report and review. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2321-3.
- ²⁷² von Baum H, Ewig S, Marre R, Suttorp N, Gonschior S, Welte T, Lück C, Competence Network for Community Acquired Pneumonia Study Group. Community-acquired *Legionella* pneumonia: new insights from the German competence network for community acquired pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2008; 46: 1356-64.
- ²⁷³ Wagner C, Krönert C, Lück PC, Jacobs E, Cianciotto NP, Helbig JH. Random mutagenesis of *Legionella pneumophila* reveals genes associated with lipopolysaccharide synthesis and recognition by typing monoclonal antibodies. *J Appl Microbiol*. 2007; 103: 1975-82.
- ²⁷⁴ Wang C, Chuai X, Liang M. *Legionella feeleii*: pneumonia or Pontiac fever? Bacterial virulence traits and host immune response. *Med Microbiol Immunol*. 2019; 208: 25-32.
- ²⁷⁵ Wewalka G, Schmid D, Harrison TG, Uldum SA, Lück C; European Society of Clinical Microbiology Infectious Diseases Study Group for *Legionella* Infections (ESGLI). Dual infections with different *Legionella* strains. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20: O13-9.
- ²⁷⁶ Whiley H, Keegan A, Fallowfield H, Ross K. Uncertainties associated with assessing the public health risk from *Legionella*. *Front Microbiol*. 2014; 5: 501.
- ²⁷⁷ Wilkinson HW, Thacker WL, Benson RF, Polt SS, Brookings E, Mayberry WR, Brenner DJ, Gilley RG, Kirklin JK. *Legionella birminghamensis* sp. nov. isolated from a cardiac transplant recipient. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 2120-2.

- ²⁷⁸ Wilson D, Yen-Lieberman B, Reischl U, Warshawsky I, Procop GW. Comparison of five methods for extraction of *Legionella pneumophila* from respiratory specimens. J Clin Microbiol. 2004; 42: 5913-6.
- ²⁷⁹ Woodhead M, Blasi F, Ewig S, Garau J, Huchon G, Ieven M, Ortqvist A, Schaberg T, Torres A, van der Heijden G, Read GR, Verheij TJM, Joint Taskforce of the European Respiratory Society and European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Guidelines for the management of adult lower respiratory tract infections. Clin Microbiol Infect 2011; 17(Suppl. 6): E1–E59.
- ²⁸⁰ World Health Organization. Manual de bioseguridad en el laboratorio, 3ª edición. World Health Organization, Geneva, 2005.
- ²⁸¹ World Health Organization. Legionellosis. 2018. Disponible en línea: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs285/en/>.
- ²⁸² Xiao-Yong Z, Lian-Qing L, Chao-Hui H, Qing-Yi Z. Two-step scheme for rapid identification and differentiation of *Legionella pneumophila* and non-*Legionella pneumophila* species. J Clin Microbiol 2010; 48: 433-9.
- ²⁸³ Yang G, Benson RF, Ratcliff RM, Brown EW, Steigerwalt AG, Thacker WL, Daneshvar MI, Morey RE, Saito A, Fields BS. *Legionella nagasakiensis* sp. nov., isolated from water samples and from a patient with pneumonia. Int J Syst Evol Microbiol. 2012; 62: 284-8.
- ²⁸⁴ Yu AT, Kamali A, Vugia DJ. *Legionella* epidemiologic and environmental risks. Curr Epidemiol Rep. 2019; 6: 310–20.
- ²⁸⁵ Zhu Q-Y. *Legionella* pathogenesis and virulence factors. Ann Clin Lab Res. 2015; 3: 15.
- ²⁸⁶ Zink SD, Pedersen L, Cianciotto NP, Abu-Kwaik Y. The Dot/Icm type IV secretion system of *Legionella pneumophila* is essential for the induction of apoptosis in human macrophages. Infect Immun. 2002; 70: 1657-63.