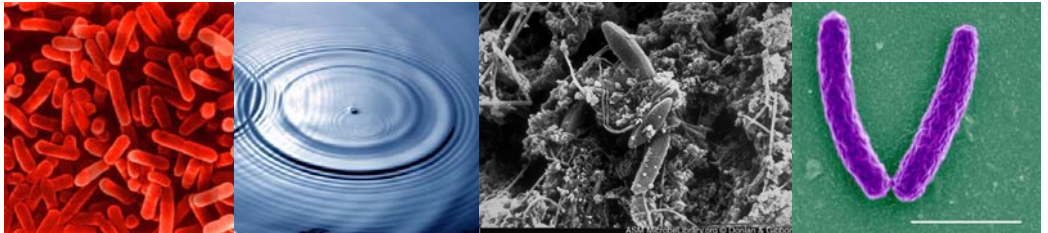


**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**  
**Facultat de Ciències**  
**Departament de Genètica i Microbiologia**



**DESARROLLO, OPTIMIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE NUEVOS MÉTODOS  
INMUNOLÓGICOS Y MOLECULARES EN EL DIAGNÓSTICO DE LAS  
INFECCIONES CAUSADAS POR *Legionella pneumophila***



**Silvia Blanco Palencia**

**2010**



**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

**Facultat de Ciències  
Departament de Genètica i Microbiologia**

**DESARROLLO, OPTIMIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE NUEVOS MÉTODOS  
INMUNOLÓGICOS Y MOLECULARES EN EL DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES  
CAUSADAS POR *LEGIONELLA PNEUMOPHILA***

**Memoria presentada por  
Silvia Blanco Palencia para optar  
al grado de Doctor  
por la Universitat Autònoma de Barcelona.**

**V<sup>o</sup>B<sup>o</sup> de los Directores de la Tesis**

**Dr. José Antonio Domínguez Benítez**

**Dr. Vicente Ausina Ruiz**



**Bellaterra, Mayo 2010**



*Dedicada a mi familia y en especial a mis  
padres, quienes, con mucho esfuerzo, me pusieron en el camino.*

Existe al menos un rincón del universo  
que con toda seguridad puedes mejorar,  
y eres tú mismo.  
*Aldous Huxley*



# ÍNDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>9</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>15</b>
<b>ARTÍCULOS EN LOS QUE SE BASA ESTA TESIS .....</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>19</b>
1.1. Antecedentes históricos.....	21
1.2. Taxonomía .....	22
1.3. Características microbiológicas.....	24
1.3.1. Morfología y fisiología.....	24
1.3.2. Requerimientos nutricionales .....	25
1.4. Epidemiología .....	27
1.4.1. Ecología y fuentes de infección .....	27
1.4.2. Modo de transmisión .....	28
1.4.3. Relación con los protozoos.....	30
1.4.4. Biofilms .....	32
1.5. Patogénesis.....	35
1.5.1. Mecanismos de patogenicidad.....	35
1.5.2. Respuesta inmune frente a <i>Legionella</i> .....	37
1.5.2.1 Inmunidad innata frente a <i>Legionella</i> .....	38
1.5.2.2 Inmunidad específica frente a <i>Legionella</i> .....	39
1.6. Presentación clínica.....	41
1.6.1. Fiebre de Pontiac .....	41
1.6.2. Legionelosis.....	42
1.6.3. Infección extrapulmonar .....	43
1.7. Diagnóstico .....	44
1.7.1. Anatomía patológica.....	44
1.7.2. Radiografía de tórax.....	45
1.8. Diagnóstico microbiológico .....	46
1.8.1. Examen microscópico.....	46
1.8.2. Cultivo e identificación.....	47
1.8.3. Diagnóstico serológico.....	50
1.8.4. Detección de antígeno de <i>L. pneumophila</i> en muestras de orina.....	51
1.8.5. Detección de <i>Legionella</i> en muestras clínicas por técnicas de amplificación genética .....	53
1.9. Marcadores de inflamación .....	55
1.10. Tratamiento .....	56
1.11. Prevención y control de la legionelosis.....	57
1.11.1. Métodos preventivos .....	58
1.11.2. Torres de refrigeración .....	59
1.11.3. Redes internas.....	61
1.11.4. Medidas de desinfección complementarias .....	62
1.12. Estudio de Brotes.....	63
1.12.1. Investigación de brotes comunitarios.....	64
1.12.2. Investigación de brotes nosocomiales.....	65
1.12.3. Toma y análisis de muestras ambientales .....	65
1.12.4. Tipaje molecular de <i>Legionella</i> .....	66
1.12.4.1 Métodos fenotípicos .....	67
1.12.4.2 Métodos genotípicos.....	68
<b>2. JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS .....</b>	<b>73</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>79</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>83</b>
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>117</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>123</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>139</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>189</b>





## RESUMEN

*Legionella* es un bacilo gramnegativo móvil que se identificó por primera vez en 1976. Desde entonces ya se han descrito más de 50 especies diferentes y numerosos serogrupos. Es una bacteria ampliamente distribuida en la naturaleza, siendo su nicho natural el medio acuático. Su amplia distribución en el medio hace inviable, actualmente, llevar a cabo actuaciones preventivas dirigidas a su reservorio natural. Existen diversos factores que hacen de *Legionella* un microorganismo de especial interés, sus características microbiológicas, la interacción con los protozoos de vida libre en su hábitat acuático y, por último por su capacidad patógena mediante mecanismo invasor.

*Legionella* es responsable del 3-15% de las neumonías adquiridas en la comunidad y es, asimismo, causa frecuente de neumonía intrahospitalaria. En la comunidad la mayoría de casos se presentan de forma esporádica, aunque en ocasiones, también en forma de brote epidémico. Las fuentes más frecuentes de infección son las torres de refrigeración, así como los sistemas de agua corriente, especialmente los sistemas de distribución de agua caliente.

El diagnóstico de la legionelosis puede realizarse por aislamiento del agente causal a partir de muestras respiratorias, por detección de antígenos, técnicas de detección de DNA y también mediante la detección de anticuerpos específicos por serología. El aislamiento del microorganismo por cultivo a partir de muestras respiratorias, si las muestras seleccionadas son adecuadas, puede llegar a tener una sensibilidad del 70% y una especificidad del 100%, pudiendo detectar todas las especies del género y serogrupos. Sin embargo, tiene ciertas limitaciones dada la naturaleza de la bacteria que crece con dificultad aún en medios selectivos, la limitada supervivencia de la bacteria en las muestras clínicas, la aplicación de una terapia antibiótica previa a la toma de muestra y la experiencia microbiológica requerida para su aislamiento.

La detección directa en muestras respiratorias de *L. pneumophila* serogrupo 1 por inmunofluorescencia directa tiene una sensibilidad que oscila entre el 25 y el 70% y una especificidad del 95%. Las técnicas de detección de antígeno en orina son muy útiles para el diagnóstico rápido de la neumonía por *Legionella*,

dado que la orina constituye un excelente reservorio de antígeno. La primera prueba disponible fue una técnica de radioinmunoensayo, que exigía disponer de instalaciones radiactivas. La sustitución de aquella por técnicas de enzimoimmunoensayo y de inmunocromatografía ha permitido su incorporación como técnica diagnóstica en la mayoría de laboratorios. Dado que el antígeno de *Legionella* es termoestable, es recomendable aplicar un tratamiento térmico a la muestra para evitar falsos positivos. Además, la concentración del antígeno presente en la orina, incrementa la sensibilidad de las técnicas descritas sin afectar la especificidad. La sensibilidad de estas técnicas varía entre un 60 y un 90%, en función de la técnica y si se concentra o no la orina, mientras que su especificidad es muy elevada (>99%).

Por otro lado, durante un brote epidémico de *Legionella*, es importante identificar la fuente de infección responsable. La detección de instalaciones de riesgo permitirá establecer hipótesis sobre el posible origen del brote. Esto, junto a los análisis microbiológicos obtenidos de muestras clínicas y de estas instalaciones, posibilitará la identificación del foco causal.

A pesar de que las nuevas técnicas de detección de antígeno han supuesto una mejora considerable en el diagnóstico etiológico de las neumonías por *Legionella*, en muchos casos es necesario concentrar la muestra por ultrafiltración selectiva para obtener una sensibilidad suficiente. En determinadas situaciones, los procesos de concentración por ultrafiltración pasiva de la orina pueden suponer un retraso en la obtención de los resultados.

En muchos casos en que *Legionella* es aislada a partir de muestra clínica, la identificación bioquímica y la basada en técnicas de inmunofluorescencia son insuficientes para la identificación correcta a nivel de especie.

Además, en situaciones de brote epidémico, en que es fundamental detectar el foco responsable, los cultivos que se emplean de forma habitual, así como las técnicas moleculares para establecer relaciones epidemiológicas, son lentas por un lado y también laboriosas, retrasando la identificación del foco.

De esta forma, los objetivos iniciales de esta la tesis se han centrado en la estandarización y evaluación clínica de nuevas técnicas inmunológicas

cualitativas y cuantitativas de detección de antígeno de *Legionella* en orina para el diagnóstico, así como de nuevos métodos de concentración de antígeno por centrifugación.

En primer lugar, se han evaluado nuevas técnicas de detección de antígeno y al comparar los resultados de la técnica EIA de Bartels con el EIA de Binax, hemos observado que la sensibilidad en muestras de orina no concentrada es mayor con esta nueva técnica sin deterioro de la especificidad. En el caso de la orina concentrada, ambas técnicas muestran una elevada sensibilidad y un 100% de especificidad, ofreciendo por lo tanto una alternativa al EIA Binax cuando se realiza en orina no concentrada. En el caso de la ICT Uni-Gold LUA es también una alternativa en el diagnóstico de la legionelosis, reduciendo el tiempo si lo comparamos con las técnicas de EIA y con unos resultados comparables a la ICT de Binax. Recientemente, se ha podido evaluar una segunda versión de esta nueva ICT (Uni-Gold LUA plus) que ofrece unos valores de sensibilidad y especificidad iguales a la ICT de Binax tanto en orina no concentrada como en orina concentrada.

En segundo lugar se han estandarizado técnicas de concentración. El tiempo necesario para concentrar una muestra de orina, para la posterior detección de antígeno por ultrafiltración pasiva es de 1 a 3 horas, aunque dependiendo de las características físicas de la muestra, puede llegar incluso a tardar más de 6 horas. Esto constituye un inconveniente importante de cara al diagnóstico rápido de la legionelosis. Por ese motivo evaluamos una nueva técnica de concentración por centrifugación disminuyendo el tiempo a unos 15-20 minutos. La concordancia global entre las dos técnicas de concentración fue del 100%.

La concentración por ultrafiltración selectiva por centrifugación es un método rápido y fiable para la concentración de antígeno de *Legionella* en muestras de orina sin disminución de la sensibilidad ni la especificidad. Este sistema permite reducir drásticamente el tiempo en el diagnóstico de la legionelosis mediante detección de antígeno.

Por lo que respecta a la cuantificación, al utilizar el EIA de Binax para cuantificar la concentración de antígeno presente en las muestras de orina de pacientes con legionelosis hemos observado que la cantidad de antígeno en la orina de los pacientes es mayor en los que tienen peor evolución. En los pacientes en que se resolvió completamente la neumonía la cantidad de antígeno presente en orina disminuyó significativamente a los 3-6 días respecto a la concentración de antígeno presente en el momento del ingreso ( $p < 0.0001$ ). En cambio en los pacientes con peor evolución y en aquellos que fallecieron la disminución de carga antigénica en orina no fue significativa.

Los resultados de este estudio sugieren una correlación entre una mayor concentración de antígeno y una peor evolución de los pacientes. Por ahora, no hay ningún otro trabajo en el que se describa la relación entre la cuantificación de la concentración del antígeno en orina y la gravedad de la neumonía por *Legionella*.

En esta tesis, también se incluye la evaluación de una técnica inmunológica de detección de antígeno en muestras ambientales para su utilización en el cribaje medioambiental. En este apartado, se estudiaron muestras de agua artificiales en las que se inoculó *Legionella* y muestras de agua reales (procedentes de sistemas de agua doméstica y de torres de refrigeración).

En nuestro estudio, en las muestras de agua artificial el EIA de Bartels fue capaz de detectar antígeno de todos los serogrupos, aunque mostró una mayor sensibilidad para *L. pneumophila* serogrupo 1. El EIA no fue capaz de detectar antígeno de *Legionella bozemanii* y *Legionella longbeachae*. El límite de detección en agua artificial para el serogrupo 1 fue de 780 ufc/ml en el agua original antes de la filtración. Si analizamos los resultados de las muestras de agua de abastecimiento, el EIA de Bartels fue positivo en 8 muestras de agua procedentes de torres de refrigeración, en 7 de las cuales el cultivo fue negativo. Estos deberían ser considerados como falsos positivos. Sin embargo, debido a la contaminación de los cultivos con otras bacterias, no podemos descartar la posibilidad de que estas 7 muestras fueran realmente positivas y que el sobrecrecimiento bacteriano impidiera su aislamiento. Dado que los

brotos de legionelosis suelen ir vinculados a una amplificación de los niveles de *Legionella* en los sistemas de agua y que durante un brote son necesarias una rápida identificación y descontaminación del sistema de agua colonizado, la detección de antígeno mediante EIA podría ser útil como un método rápido de cribado para analizar un alto número de muestras.

Finalmente, la tesis se completa con la evaluación de técnicas de secuenciación para la identificación a nivel de especie del género *Legionella* y de tipaje molecular intraespecífico.

Durante los últimos años, ha aumentado el uso de la secuenciación en diferentes ámbitos de la Microbiología. Los objetivos 5 y 6 de esta Tesis se enmarcan en un proyecto de colaboración europeo, liderado por el EWGLI (*European Working Group for Legionella Infection*), para establecer la utilidad y la robustez de la secuenciación del gen *mip* (*macrophage infectivity potentiator*) y determinar la utilidad de una técnica de secuenciación de 6 genes (MLST) para la tipificación de cepas de *L. pneumophila* para implementarlo como método de referencia en diferentes laboratorios europeos mediante una aplicación *online* de análisis.

El objetivo del estudio fue optimizar la identificación de cepas de *Legionella* mediante la secuenciación del gen *mip*. Los resultados obtenidos muestran que la identificación de *Legionella* spp. mediante la secuenciación de este gen es una técnica sólida, y que la mayoría de los laboratorios son capaces de reproducir y de dar un resultado correcto. El estudio, sin embargo, también ha demostrado que en laboratorios no habituados a la realización de este tipo de técnicas es necesario realizar una formación adecuada por personal especializado para poder obtener resultados fiables.

En nuestro estudio, la homología de la secuencia de una cepa de *Legionella* de especie desconocida con las especies de *Legionella* incluidas en la base de datos obtendría unos porcentajes de similitud entre el 98-100%. Si observamos los resultados obtenidos para las cepas salvajes analizadas vemos que la mayoría de los laboratorios obtiene resultados >98%. Para ayudar en el análisis de los resultados, se ha implementado una herramienta de análisis de la calidad

de la secuencia: la secuencia se puede cargar *online* y la herramienta nos proporciona automáticamente la calidad de la secuencia. Esta herramienta hace que los resultados sean menos subjetivos, aunque es necesaria una secuencia de cómo mínimo 300 nucleótidos.

La identificación genotípica de *Legionella* spp. es una herramienta necesaria en los laboratorios de referencia. Disponer de protocolos estandarizados, librerías de genes para la identificación y herramientas *online* suponen una gran ayuda.

Actualmente, la necesidad de disponer de métodos de caracterización molecular que ofrezcan resultados rápidos y reproducibles, con la posibilidad de ser compartidos en tiempo real por diferentes laboratorios, ha llevado al desarrollo de métodos de secuenciación de genes basados en técnicas de MLST y ha sido empleada para la tipificación molecular de *L. pneumophila* serogrupo 1. Los resultados obtenidos con el estudio de seis genes, *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS* y *proA*, que son los que se han empleado en el primer estudio piloto de *Sequence Base Typing* en el EWGLI, son muy prometedores, existiendo actualmente una base de datos a la que se puede acceder para la asignación de alelos ([www.ewgli.org](http://www.ewgli.org)). Aunque los brotes de legionelosis pueden aparecer en distintos ámbitos (hospitalario, comunitario o relacionado con viajeros) la estrategia para la tipificación epidemiológica de las cepas de *Legionella* puede ser la misma para todos ellos.

**ABREVIATURAS**

<b>RNAr</b>	Ácido ribonucleico ribosomal
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>CAP</b>	<i>Competence and adherence associated Pili</i>
<b>mip</b>	<i>Macrophage infectivity potentiator</i>
<b>mil</b>	<i>Macrophage infectivity loci</i>
<b>EPOC</b>	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
<b>PAMPs</b>	<i>Pathogen associated molecular patterns</i>
<b>PRR</b>	<i>Pattern recognition receptors</i>
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	<i>Nuclear factor kappa B</i>
<b>dot</b>	<i>Defect in organelle trafficking</i>
<b>icm</b>	<i>Intracelular multiplication</i>
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral <i>alpha</i>
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>Th</b>	T helper
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>BCYE<math>\alpha</math></b>	<i>Buffered charcoal yeast extract <math>\alpha</math>-ketoglutarate</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>IFI</b>	Inmunofluorescencia indirecta
<b>EIA</b>	Enzimoimmunoensayo
<b>RIA</b>	Radioinmunoensayo
<b>ICT</b>	Inmunocromatografía
<b>PCT</b>	Procalcitonina
<b>CDC</b>	<i>Centers for Diseases Control</i>
<b>SDS-PAGE</b>	<i>SDS-polyacrilamide gel electrophoresis</i>
<b>RFLP</b>	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
<b>PFGE</b>	<i>Pulsed field gel electrophoresis</i>
<b>RAPD</b>	<i>Random amplification of polymorphic DNA</i>
<b>AP-PCR</b>	<i>Arbitrary primer-PCR</i>
<b>AFLP</b>	<i>Amplified fragment lenght polymorphism</i>
<b>MLST</b>	<i>Multilocus sequence typing</i>
<b>SBT</b>	<i>Sequence base typing</i>
<b>flaA</b>	<i>Flagellum subunit protein</i>
<b>pilE</b>	type IV pilin genes
<b>asd</b>	<i>Aspartate-b-semialdehyde gene</i>
<b>mompS</b>	<i>Major outer membrane protein precursor</i>
<b>proA</b>	<i>Zinc metalloprotease gene</i>
<b>rpoB</b>	RNA polymerase beta-subunit gene
<b>ONC</b>	Orina no concentrada
<b>OC</b>	Orina concentrada
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>





## ARTÍCULOS EN LOS QUE SE BASA ESTA TESIS

### Artículo 1

Domínguez J, Galí N, Blanco S, Pedroso P, Prat C, Matas L, Ausina V.  
Assessment of a new test to detect *Legionella* urinary antigen for the diagnosis of Legionnaire's Disease. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease*. 2001. 41:199-203.

### Artículo 2

Blanco S, Lacoma A, Prat C, Cuesta M, Fuenzalida L, Latorre I, Ausina V, Domínguez J.  
Detection of *Legionella* antigen in nonconcentrated and concentrated urine samples by a new immunochromatographic assay.  
*European J Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2008. 27:1249-51.

### Artículo 3

Blanco S, Prat C, Pallares MA, Matas L, Domínguez J.  
Centrifugal ultrafiltration method for rapid concentration of *Legionella pneumophila* urinary antigen. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004. 42:4410.

### Artículo 4

Blanco S, Prat C, Andreo F, Sánchez MD, Galí N, Lacoma A, Ausina V, Domínguez J.  
Severity of *Legionella* pneumonia associated with urine antigen load. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. *Submitted*

### Artículo 5

Blanco S, Prat C, Sánchez MD, Haba L, Vilaplana C, Matas L, Ausina V, Domínguez J.  
Evaluation of a *Legionella* urinary antigen enzyme immunoassay for rapid detection of *Legionella pneumophila* in water samples.  
*International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2008. 211:168-71.

### Artículo 6

Afshar B, Fry NK, Bellamy W, Underwood AP, Harrison TG and members of the European Working Group of *Legionella* infections.  
External Quality Assessment of a DNA sequence-based scheme for epidemiological typing of *Legionella pneumophila* by an international network of laboratories.  
*Journal of Clinical Microbiology*. 2007. 45:3251-3256.

### Artículo 7

Fry NK, Afshar B, Bellamy W, Underwood AP, Ratcliff RM, Harrison TG and members of the European Working Group of *Legionella* infections.  
Identification of *Legionella* spp. by 19 European reference laboratories: results of the EWGLI External Quality Assessment Scheme using DNA sequencing of the macrophage infectivity potentiator gene and dedicated online tools.  
*Clinical Microbiology and Infection*. 2007. 13:1119-1124.

† The members of the *European Working Group for Legionella Infections* who participated in this study were as follows: A. Indra, A. Deplano, P. Tilley, K. Bernard, J. Bangsberg, S. Nielsen, J. Etienne, S. Mentula, P. C. Lück, L. Franzin, M. Scaturro, and P. Visca, J. Amemura, J. Mossong, J. P. Bruin, K. van der Zwaluw, D. A. Caugant, T. Marques, D. S. Lindsay, S. Blanco, C. Pelaz, F. Fendukly, B. Herrmann, V. Gaia, S. Lai and R. F. Benson.



# INTRODUCCIÓN

---



## INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes históricos

La legionelosis es una enfermedad relativamente nueva cuyo descubrimiento se produjo en el año 1976, como consecuencia de un brote de neumonía en un hotel de Filadelfia que afectó a miembros de la legión americana que celebraban su convención anual. Hubo un total de 221 afectados de los cuales 34 fallecieron (1). En los primeros estudios se realizaron diferentes tinciones y cultivos, así como pruebas serológicas y todos ellos fracasaron. Fueron McDade y colaboradores (2) quienes mediante la tinción de Giménez observaron por primera vez la presencia de bacilos gramnegativos en muestras de hígado y bazo de cobayas infectados con muestras procedentes de pacientes fallecidos. También pudieron demostrar que la mayoría de los pacientes del brote de Filadelfia habían desarrollado anticuerpos frente a estos microorganismos. Posteriormente en el año 1979 se consiguió formular el medio óptimo para el crecimiento de estas bacterias (3). En memoria a los primeros pacientes afectados y por su afinidad por producir infección pulmonar este microorganismo recibió el nombre de *Legionella pneumophila* y al proceso neumónico legionelosis.

Retrospectivamente, mediante pruebas serológicas, *L. pneumophila* se identificó como causante de otros brotes en ese mismo hotel en 1974; en un hospital psiquiátrico de Washington en 1965 (4) y en una planta envasadora de carne en Minnesota en 1957 (5). También existe una forma no neumónica, relacionada serológicamente con *L. pneumophila* y otras especies de *Legionella* que recibe el nombre de fiebre de Pontiac, por ser en la ciudad de Pontiac donde se produjo el primer brote de esta forma no neumónica de infección por *Legionella*.

La dificultad de crecimiento de *Legionella* en los cultivos convencionales, así como su presentación clínica hizo que su diagnóstico fuese poco frecuente y se catalogasen dichas neumonías bajo el epígrafe de atípicas, consideradas únicamente en relación con brotes comunitarios y casos nosocomiales. En 1990 se introdujo en el mercado un nuevo test diagnóstico de detección de antígeno a partir de muestras de orina, lo que hizo aumentar la detección, y por tanto, la

incidencia de la enfermedad y convirtiéndose este en uno de los principales agentes de neumonía adquirida en la comunidad.

## 1.2. Taxonomía

*Legionella pneumophila* pertenece a la familia *Legionellaceae*, género *Legionella*, de la que existen más de 50 especies descritas (*L. pneumophila*, *Legionella micdadei*, *Legionella anisa*, *Legionella bozemanii*, etc.) con más de 70 serogrupos. No todas las especies de esta familia causan patología, y de entre los que producen enfermedad, los que más frecuentemente se aíslan son los serogrupos 1, 4 y 6 de *L. pneumophila* y *L. micdadei* (6).

Todas las especies de este género se encuentran presentes en medios acuáticos. La gran mayoría de las infecciones humanas son pulmonares y se producen después de la exposición a una fuente ambiental de *Legionella*. De entre todas ellas se han identificado 18 especies, aisladas de muestras clínicas y de tejidos (7) (identificada por tinción directa con anticuerpos marcados con fluorescencia) capaces de producir infección en humanos. El resto de especies se han aislado únicamente del medio natural, medios acuáticos y tierra (8-11), aunque varias fueron involucradas en casos de infección humana por la presencia de seroconversión pero con los cultivos negativos.

Algunos investigadores propusieron, por la proximidad de las familias *Legionellaceae* y *Coxiellaceae*, incluirlas en un solo orden "*Legionellales*". *Coxiella burnetii* comparte muchas características con *L. pneumophila* como el parasitismo intracelular y mucha homología en algunos genes de virulencia (12). También se propuso incluir dentro de la familia *Legionellaceae*, otros dos géneros: *Tatlockia* y *Fluoribacter*, pero estudios de la secuencia de RNAr 16S demostraron que esta familia es monofilética.

Como ocurre con otras bacterias telúricas, el estudio del hábitat natural de este grupo de bacterias ha permitido el descubrimiento de nuevas especies y es más probable que el número de especies siga en aumento en el futuro. En la tabla 1 se muestran las especies de *Legionella* de interés médico.

Tabla 1. Especies de *Legionella* aisladas en el ser humano.

Especies	Nº de serogrupos
<i>L. pneumophila</i>	15
<i>L. micdadei</i>	1
<i>L. anisa</i>	1
<i>L. birminghamensis</i>	1
<i>L. bozemanii</i>	2
<i>L. cincinnatiensis</i>	1
<i>L. dumoffii</i>	1
<i>L. feeleii</i>	2
<i>L. gormanii</i>	1
<i>L. hackeliae</i>	2
<i>L. israelensis</i>	1
<i>L. jordanis</i>	1
<i>L. lansingensis</i>	1
<i>L. longbeachae</i>	2
<i>L. maceachernii</i>	1
<i>L. oakridgensis</i>	1
<i>L. sainthelensi</i>	2
<i>L. tucsonensis</i>	1
<i>L. wadsworthii</i>	1

Según los resultados obtenidos del análisis de las secuencias de RNAr 16S existen otros microorganismos que muy posiblemente formen parte del género *Legionella* (13). A partir de estos análisis filogenéticos se podría pensar que estos microorganismos pertenecen como mínimo a 5 especies diferentes (14). Estos microorganismos, denominados patógenos amebianos *Legionella-like*, infectan amebas de agua dulce y se encuentran presentes en medios acuáticos donde también puede desarrollarse *Legionella*. Uno de los miembros de este grupo fue aislado en un paciente con neumonía mediante el co-cultivo del esputo con amebas. Los patógenos amebianos *Legionella-like* se desarrollan con dificultad o no pueden desarrollarse en los medios de cultivo donde habitualmente es capaz de crecer la *Legionella*.

### 1.3. Características microbiológicas

#### 1.3.1. Morfología y fisiología

Las legionelas son bacterias capaces de sobrevivir en un amplio intervalo de condiciones físico-químicas, multiplicándose entre 20°C y 45°C, pudiendo permanecer viables hasta 70°C, siendo su temperatura óptima de crecimiento de 35°C a 37°C. Los miembros de la familia *Legionellaceae* son bacilos aerobios gramnegativos no formadores de esporas y no capsulados que miden de 0.3 a 0.9 µm de ancho y de 2 a 20 µm de largo. *Legionella* es un microorganismo aeróbico estricto que necesita oxígeno para su supervivencia y en general es metabólicamente poco activo. Son móviles por la presencia de uno o más flagelos polares o subpolares. También se ha demostrado la presencia de fimbrias (15) y de una estructura polisacárida extracelular (16). Se tiñen débilmente con la coloración de Gram como gramnegativos, pero se tiñen bien con la coloración de Giménez o con técnicas argénticas (técnicas de Dieterle y Warthin-Starry). *L. micdadei* se diferencia de las otras especies por ser ácido-alcohol resistente después de tinción con una técnica modificada (17).

El lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa de la pared presenta características diferenciales con respecto al de las enterobacterias, tanto en aspectos bioquímicos, es muy rico en ácidos grasos ramificados, a diferencia de lo que se da en bacterias gramnegativas (18), como en la actividad endotóxica. Sin embargo, continua siendo una estructura antigénica similar a otras bacterias gramnegativas (19, 20).

No se sabe como estas diferencias estructurales que afectan al LPS pueden tener relación con las propiedades tintoriales respecto a la tinción del Gram, la notable resistencia al calor y a los ácidos de este grupo de microorganismos. Estas dos últimas características se han empleado para la descontaminación de las muestras clínicas antes de sembrarlas en los medios de cultivos específicos para *Legionella*.

El LPS se encuentra íntimamente unido a proteínas de la membrana externa y parece bien demostrado que la antigenicidad específica se encuentra en esta estructura de la bacteria. Algunas proteínas de la membrana externa son



antígenos comunes entre diferentes serogrupos de *L. pneumophila* y con otras especies; pero otros parecen específicos de *L. pneumophila*.

Estos microorganismos contienen gran cantidad de ubiquinonas con más de 10 unidades de isoprenoides en la cadena lateral. La cromatografía líquida de alta resolución es la técnica de elección para la identificación de las quinonas aunque la cromatografía en capa fina también puede resultar útil. Otros rasgos ultraestructurales típicos de los microorganismos gramnegativos son la membrana citoplasmática trilaminar interna, la capa de peptidoglucano y la membrana trilaminar externa. *L. pneumophila* contiene una proteína de membrana externa mayor con un peso molecular de unos 24-29 kDa. Esta proteína forma canales permeables a iones en contacto con las membranas lipídicas. El LPS de *L. pneumophila* serogrupo 1 se encuentra firmemente unido a esta proteína. Los anticuerpos utilizados en técnicas de detección van dirigidos fundamentalmente contra el LPS.

*L. pneumophila* produce diversas enzimas y toxinas potenciales que pueden detectarse en sobrenadantes de cultivos o en lisados de bacterias intactas y comprenden hemolisinas, proteasas, esterases, fosfatasas, aminopetidases y endonucleasas. No se conoce el papel de estas en la patogenia y la producción de lesión tisular, dado que algunas de ellas también son producidas en cepas no virulentas. También se ha descrito una proteína secretada al exterior, una metaloproteasa de 38 kDa con propiedades hemolíticas y citotóxicas. Aunque se ha visto que esta proteína no es un factor de virulencia imprescindible para el desarrollo o supervivencia intracelular del microorganismo (21).

### **1.3.2. Requerimientos nutricionales**

Desde el punto de vista metabólico las legionelas son aerobias estrictas, capnofílicas, poco sacarolíticas y, poco activas metabólicamente. Sintetizan catalasa, pero su reacción es débil en comparación con la de otras bacterias catalasa positivas. *L. pneumophila* es negativa para la prueba de la oxidasa, ureasa y nitrataza y positiva para la gelatinasa. Es una bacteria que hidroliza el hipurato y produce un pigmento pardo similar a la melanina en medios que

contengan tirosina y otro amarillo fluorescente en un medio con agar expuesto a radiaciones ultravioletas de onda larga.

*Legionella* no es capaz de actuar sobre los hidratos de carbono ni por vía fermentativa ni oxidativa, utilizando como fuente de energía los aminoácidos que son catabolizados en el ciclo de Krebs. Además, algunos son factores esenciales para la biosíntesis. Los azúcares son sintetizados a través de la vía de Embden-Meyerhof-Parnas

*L. pneumophila* tiene requerimientos nutricionales complejos y no crece en medios bacteriológicos convencionales. El extracto de levadura-carbón activado amortiguado hasta un pH de 6.9 es el principal medio utilizado para el aislamiento de *L. pneumophila* (figura 1). La L-cisteína es un componente esencial del medio de cultivo (sobretudo en el primoaislamiento), y el hierro estimula su crecimiento. Los ingredientes activos del extracto de levadura



Figura 1. Colonias de *L. pneumophila*.

aparentemente son los derivados purínicos y pirimidínicos, entre los cuáles el más importante es la guanina. El carbón activado absorbe y detoxifica los ácidos grasos y radicales oxigenados y previene la oxidación de la cisteína (22). La adición de  $\alpha$ -cetoglutarato al medio de cultivo, promueve el desarrollo de las especies de *Legionella*, posiblemente porque participa en la eliminación de los radicales de oxígeno (23).

Inicialmente, estos requerimientos nutricionales inusuales parecen contradecir la amplia distribución de *Legionella* en ambientes acuáticos. La cantidad de nutrientes que *Legionella* requiere para su crecimiento es raramente encontrada en agua dulce pero, si estuvieran presentes, sólo servirían para amplificar bacterias de crecimiento rápido que podrían competir con *Legionella*. En realidad, estos nutrientes representan un ambiente intracelular, no nutrientes solubles comúnmente encontrados en agua dulce. Este aspecto es el que relaciona que las legionelas, en su hábitat natural acuático, se multiplican en el interior de diversos protozoos, y en el medio libre se encuentran formando parte de complejos biofilms microbianos.

## 1.4. Epidemiología

### 1.4.1. Ecología y fuentes de infección

*L. pneumophila* está ampliamente distribuída en la naturaleza y es capaz de sobrevivir en medios muy diversos. Se ha descrito que la tierra puede constituir un reservorio para la bacteria, pero es el agua su principal fuente medioambiental, que forma parte de la comunidad microbiana natural de ecosistemas acuáticos. Cualquier hábitat acuático concebible, con excepción de estuarios y ambientes salinos, es apto para su supervivencia, siendo ésta posible en una amplia variabilidad de condiciones físico-químicas y biológicas.

*L. pneumophila* es capaz de sobrevivir en una amplia gama de condiciones ambientales: temperatura, de 0 a 63°C; pH, de 5 a 8.5; oxígeno disuelto, de 0.2 a 15 mg/mL (24). *L. pneumophila* puede sobrevivir más de un año en muestras de agua conservadas a una temperatura de entre 2 y 8°C.

Las masas acuáticas naturales contienen escasas cantidades de este microorganismo. Dado que las especies de *Legionella* toleran el cloro, este microorganismo sobrevive al tratamiento del agua y aunque en cantidades reducidas, se encuentra presente en el sistema de distribución de agua potable. En ciertos hábitats artificiales, como torres de refrigeración o sistemas de suministro de agua, que aseguran condiciones favorables de temperatura, protección física y nutrición, el microorganismo puede desarrollarse y proliferar en forma significativa.

La distribución ubicua de *L. pneumophila* en depósitos acuáticos artificiales es paradójica si se tienen en cuenta las dificultades para el desarrollo y el crecimiento de estos microorganismos en el laboratorio. En la actualidad, se sabe que el desarrollo óptimo de *L. pneumophila* en el medio natural requiere la presencia de simbióticos, incluidas amebas y bacterias acuáticas (25). *L. pneumophila* es capaz de infectar amebas y protozoos ciliados y multiplicarse en el interior de estos organismos (26). La ruptura de los protozoos huésped de *L. pneumophila* libera una gran cantidad de microorganismos móviles, situación similar a la observada en las células mononucleares humanas. La localización

intracelular del microorganismo puede facilitar la supervivencia en un medio desfavorable.

La colonización de los sistemas de distribución de agua por *L. pneumophila* depende de una combinación de varios factores, incluidos la temperatura del agua, la acumulación de sedimento y la microflora comensal (27-29). *L. pneumophila* se encuentra en las superficies del sedimento que se acumula en las zonas de estancamiento de los sistemas de agua e incluso en las superficies de tubería metálicas (30). También se ha visto que las colonias de *L. pneumophila* adheridas a superficies son menos sensibles a los biocidas que una población planctónica.

Las torres de refrigeración y los condensadores están relacionados con muchos casos de legionelosis. Ambos sistemas por evaporación transmiten el calor a la atmósfera mediante el contacto directo con el agua. La corriente de agua sale de la torre o del condensador en forma de partículas aerosolizadas y la contaminación de estas partículas sería responsable de la transmisión del microorganismo a personas susceptibles. La fiebre de Pontiac se correlacionó con partículas aerosolizadas provenientes de condensadores por evaporación, torres de refrigeración, equipos de aire acondicionado y piscinas de hidromasaje (31).

El descubrimiento de que *L. pneumophila* es capaz de colonizar los sistemas de suministro de agua (32) condujo a estudios más rigurosos que determinaron que el reservorio primario de *L. pneumophila* es el sistema de distribución de agua potable. La adquisición de la legionelosis en la comunidad también se correlacionó con la contaminación de los sistemas de suministro de agua en centros de rehabilitación, instituciones geriátricas y suministros industriales de agua.

#### **1.4.2. Modo de transmisión**

La neumonía es el cuadro de presentación de casi todos los pacientes con legionelosis, lo que indica que la puerta de entrada primaria es el tracto respiratorio. Está demostrado que la vehiculización se produce mediante la formación de aerosoles a partir de depósitos de agua contaminada, pudiendo

estar también presente en el polvo cuando tienen lugar movimientos de tierra por obras. La inhalación de estas partículas y el impacto que produce a nivel del alveolo pulmonar es lo que puede desencadenar la infección, por lo que es lógico que muchos de los brotes epidémicos se hayan producido en ambientes donde tenía lugar la formación de este tipo de aerosoles.

El primer aislamiento ambiental de *L. pneumophila* se obtuvo de una muestra obtenida de una ducha y se supuso que el agua rociada por la ducha era una forma de transmisión del microorganismo. Sin embargo, estudios de simulación demostraron que la cantidad de microorganismos aerosolizada es escasa y que los microorganismos se diseminan a una corta distancia (33, 34). Estudios epidemiológicos demostraron que las duchas no representan un factor de riesgo (35, 36). Los equipos respiratorios, incluidos los nebulizadores y los humidificadores, llenos de agua corriente pueden transmitir *L. pneumophila* en forma de partículas atomizadas (34).

La aspiración de agua contaminada también es una fuente de infección (37). Uno de los principales brotes nosocomiales se registró en una población de pacientes quirúrgicos con neoplasias de estructuras de la cabeza y del cuello con tendencia a la aspiración como secuela de la intervención quirúrgica (38). En varios estudios se mencionó una correlación entre la sonda nasogástrica y la legionelosis nosocomial; estos casos se atribuyeron a la microaspiración de agua contaminada (36, 39, 40).

El personal sanitario puede utilizar agua corriente para enjuagar los equipos respiratorios y los respiradores mecánicos. Se observó que los pacientes con legionelosis nosocomial habían sido intubados con más frecuencia o durante un período significativamente más prolongado que los pacientes con neumonía por otras causas (35). En la primera epidemia de 1976 en el hotel de Filadelfia, la adquisición de la infección se relacionó significativamente con el consumo de agua en el propio hotel, una asociación que fue ignorada durante mucho tiempo.

También se han descrito casos de infección de herida después de la inmersión de estas en agua contaminada (41, 42). Otra posibilidad consiste en la ingestión del microorganismo seguida de la diseminación bacteriémica desde el

tracto gastrointestinal. La diarrea también es un síntoma significativo de la enfermedad de los legionarios. Por otra parte, las evidencias clínicas que avalan esta hipótesis son escasas.

### 1.4.3. Relación con los protozoos

En el medio ambiente, *L. pneumophila* se puede presentar en forma planctónica, o parasitando intracelularmente a protistas de vida libre, como diferentes especies de amebas *Hartmannella* (figura 2), *Acanthamoebae*, *Naegleria* y un género de protozoos ciliados, *Tetrahymena* (26, 43). No se ha documentado el crecimiento de *Legionella* en la naturaleza en ausencia de protozoos, y se cree que éstos constituyen el medio de proliferación de la bacteria en el medio ambiente. La interacción huésped-parásito se ha comprobado que es crucial en la patogenia y ecología de *L. pneumophila*. En la naturaleza, los microorganismos residen frecuentemente en biofilms que consisten en microcolonias bien organizadas envueltas en matrices poliméricas.

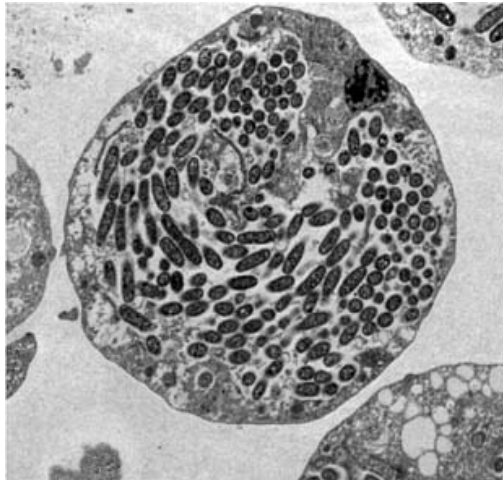


Figura 2. *Hartmannella vermiformis* infectada por *L. pneumophila*. Foto: Robert Koch-Institut

Dentro de estos biofilms, las microcolonias están separadas mediante canales de agua por donde se eliminan los desechos y se provee de nutrientes. Esta organización, facilita la comunicación entre los miembros de la microcolonia y permite una alimentación cruzada entre diferentes especies. Además, la conjugación de DNA entre bacterias que ocurre en un porcentaje muy elevado

dentro del biofilm, es también un instrumento para la evolución y la adaptación a cambios en el medioambiente. Dentro del biofilm, las amebas de vida libre constituyen el principal regulador de la población bacteriana y son organismos de interés en la adaptación de las bacterias al interior de células eucariotas.

Esta fase de interrelación procariota-eucariota, debe haber permitido la adaptación de *Legionella* a la supervivencia intracelular en el interior de protozoos (44, 45) y se ofrece así, un posible mecanismo mediante el cual estas bacterias pueden resistir situaciones adversas y propagarse rápidamente en condiciones favorables. Los estudios llevados a cabo sobre los ciclos de infección en protozoos tienden a utilizar como modelo a una ameba de vida libre, *Hartmannella vermiformis*, a pesar de que otros modelos de protozoos son también útiles. Se ha podido observar que la unión de *L. pneumophila* a *H. vermiformis* tiene lugar a través de ligandos bacterianos tipo pili. Uno de estos pili, es un pili tipo IV, designado como CAP (*Competence and Adherence associated Pili*); se ha observado que mutantes de *L. pneumophila* defectivos en la expresión del CAP manifiestan una reducción en la tasa de infección a células protozoarias, pero no se afectan en su capacidad de multiplicación intracelular (46). La unión de la bacteria a *H. vermiformis*, está mediada por la adherencia a un receptor del protozoo que se ha descrito como una galactosa N-acetil galactosamina, lectina, de 170 kDa que es tirosina fosforilada y que está asociada con otras muchas proteínas fosforiladas. La infección por *L. pneumophila* está mediada por un receptor inducido por endocitosis e implica un incremento en la actividad tirosina fosfatasa en *H. vermiformis*. Esto da como resultado una desfosforilación de la tirosina de muchas proteínas celulares del huésped como la paxilina y vinculina. La entrada de la bacteria está mediada por la inducción de la expresión génica en el huésped, que es necesaria para la invasión de *H. vermiformis* por *L. pneumophila*, ya que la inhibición de esta expresión bloquea la entrada de *Legionella*. Después de la interacción inicial entre el protozoo y el parásito, la incursión de *L. pneumophila* en las células del protozoo ocurre mediante un sistema de fagocitosis convencional (47).

De igual modo a lo que ocurre en los monocitos humanos, *L. pneumophila* sobrevive intracelularmente en el huésped, evitando la fusión fagosoma-lisosoma, dirigiéndose al interior de vesículas que están destinadas a no fusionarse con los lisosomas y proporcionando al microorganismo una posibilidad para sobrevivir y proliferar. El endosoma conteniendo la célula de *Legionella* se fusiona con las células del retículo endoplásmico del huésped y éste comienza a ser el lugar de multiplicación de la bacteria. Se ha comprobado que las cepas virulentas de *L. pneumophila* pueden parasitar amebas mientras que las células avirulentas carecen de algún factor necesario para realizar este tipo de invasión (48).

Una fase crucial en el ciclo de vida de los patógenos intracelulares, consiste en escapar de la célula huésped una vez concluida la replicación intracelular. Durante años se pensó que *Legionella* escapaba mediante un fenómeno de lisis no específica de las células huéspedes debido a la carga física y metabólica de un elevado número de bacterias intracelulares. Recientemente se ha comprobado, que *Legionella* escapa del protozoo mediante un mecanismo citolítico especializado regulado y mediado por una actividad formadora de poro (49). Esta actividad se pone en marcha, sólo cuando la bacteria ha pasado la fase logarítmica de crecimiento. Ciertas cepas mutantes de *L. pneumophila* que son defectuosas en la expresión de la actividad formadora de poro, permanecen atrapadas en el interior de la célula huésped después de la replicación intracelular. Respecto a las bases moleculares de infección del protozoo, se han identificado en los últimos años numerosos loci genéticos de *Legionella* que son requeridos para la supervivencia y multiplicación intracelular. Es interesante resaltar, que muchos de estos loci son necesarios para los procesos de infección de ambos huéspedes protozoos y mamíferos como *mip* (45) o otros que sólo se requieren para la infección en células de mamíferos como *mil* (*macrophage infectivity loci*).

#### **1.4.4. Biofilms**

Podríamos definir un biofilm como un grupo de microorganismos (bacterias, protozoos,...) normalmente en poblaciones mixtas (comunidades), que se



adhieren a una superficie y forman una estructura en 3 dimensiones y donde el componente mayoritario es, en general, el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total (figura 3). Además de agua y de las células bacterianas, la matriz del biofilm es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos secretados por los propios microorganismos que forman parte del biofilm. En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, material genómico y productos diversos procedentes de lisis de las bacterias.

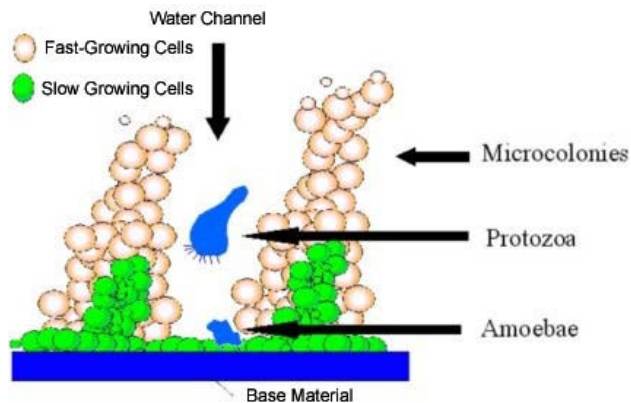


Figura 3. Esquema de la estructura de un biofilm.  
<http://www.sobs.soton.ac.uk/>

En los primeros trabajos sobre la estructura del biofilm, una de las cuestiones que surgía con mayor reiteración era cómo las bacterias del interior del biofilm podían tener acceso a los nutrientes o al oxígeno. Estudios realizados utilizando microscopía láser confocal y de epifluorescencia han mostrado que la arquitectura de la matriz del biofilm no es sólida y presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno incluso hasta las zonas más profundas (figura 4). La existencia de estos canales no evita, sin embargo, que dentro del biofilm podamos encontrarnos con ambientes diferentes en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno sea diferente. Esta circunstancia aumenta la heterogeneidad sobre el estado fisiológico en el que se encuentra la bacteria y dificulta su estudio.

*Legionella* no tiene capacidad para crecer en el laboratorio en ausencia de hierro. En las torres de refrigeración *Legionella* obtiene el hierro de partículas en suspensión y de los materiales entre los que abunda el acero. Parte de su

éxito no se debe a que sean cepas con requerimientos particulares, es decir, no son microorganismos raros. En realidad, son bacterias perfectamente adaptadas, con mecanismos de resistencia genética que les permiten obtener recursos de la degradación de los materiales sobre los que se fijan, de los restos de materia orgánica y de la relación beneficiosa con otros microorganismos. En esencia, estos microorganismos pueden crecer sin problemas, aunque para sobrevivir reducen su tamaño celular y ralentizan su capacidad para multiplicarse. Esto implica un retraso en la capacidad para recuperar su actividad celular, que lleva incluso a que en los análisis rutinarios no se consiga detectar con facilidad su presencia.

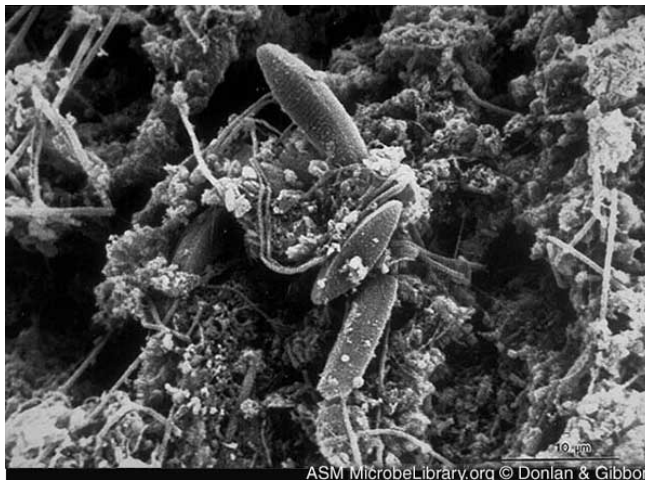


Figura 4. Fotografía con microscopía electrónica de un biofilm de un sistema de agua industrial. Rodney Donlan and Donald Gibbon ASM.

A diferencia de otras situaciones, es interesante destacar que un crecimiento enlentecido no es sinónimo de lesión o de eliminación de la bacteria, sino de resistencia, puesto que al no poder crecer, la cantidad de sustancias que entra en la célula es menor. Ello implica que al utilizar desinfectantes que necesitan entrar en el interior del citoplasma no tengan ningún efecto, como por ejemplo los alcoholes y la mayoría de los acidificantes y las sales.

La creación de un biofilm representa una ventaja competitiva para la supervivencia y un incremento de la resistencia esperada. Así, estas bacterias pueden ser hasta 1000 veces más resistentes a los desinfectantes que las bacterias que están en suspensión. Entre los mecanismos responsables de la

resistencia se incluyen la barrera física y química, que constituye la matriz de exopolisacáridos que forma el biofilm. También lo es el crecimiento enlentecido de las bacterias del biofilm provocado por la limitación de nutrientes.

Además, la existencia de microambientes que antagonicen con la acción del desinfectante o la existencia de sustancias de desecho del metabolismo del microorganismo que fijen o inhiban la acción del desinfectante también es uno de los mecanismos de la resistencia. Por último, también lo es la activación de respuestas de estrés que provocan cambios en la fisiología de la bacteria y la aparición de características específicas en el biofilm que activamente combata los efectos negativos de las sustancias desinfectantes. Todos estos factores, bien de forma individual o asociada, confieren un sistema de resistencia que impide la eliminación completa del microorganismo si no hay estrategias específicas.

## **1.5. Patogénesis**

### **1.5.1. Mecanismos de patogenicidad**

La legionelosis aparece fundamentalmente en personas mayores, con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), en personas que toman glucocorticoides y en enfermos transplantados (50).

Como se ha explicado en el apartado anterior las legionelas son capaces de multiplicarse en un protozoo y de sobrevivir a la fagocitosis por el macrófago alveolar. Los factores de virulencia que facultan a las legionelas para la multiplicación intracelular, tanto en los protozoos como en los macrófagos, han sido muy estudiados en las diferentes etapas del proceso: endocitosis, vacuolización, multiplicación y, finalmente, liberación de las células. Se conoce que los factores de virulencia no son idénticos entre especies de *Legionella* aisladas de procesos patológicos humanos, ni en una misma especie no es idéntica la activación de los factores de virulencia en el interior de una ameba o de un macrófago humano (46).

La endocitosis por el macrófago, que tiene lugar mediante la formación de unos pseudópodos particulares que forman una especie de espiral para constituir,

finalmente, una vacuola fagocítica en el citoplasma (fagosoma) en la que se localiza la bacteria. El mecanismo por el que el fagosoma se rodea de retículo endoplasmático de manera que se impide la fusión con los lisosomas parece depender de unas proteínas secretadas por la bacteria y que modifican las membranas del fagosoma, y quizás también, del retículo y del lisosoma (51, 52). Los sistemas de excreción de estas proteínas bacterianas corresponden, probablemente, a sistemas del grupo II y IV, que han sido objeto de numerosos estudios (49, 53). *L. pneumophila* constituye, por tanto, un ejemplo interesante para estudiar la fisiología del tráfico de membranas intracelulares y de los compartimentos que delimitan a los macrófagos, tráfico que está directamente relacionado con la destrucción de las bacterias patógenas (figura 5).

Numerosos estudios de mutagénesis han demostrado la existencia de diversos genes relacionados con estos procesos. Gao et al. (54) utilizaron mutantes de *L. pneumophila* estudiando su replicación en macrófagos y amebas, y esperando que los mutantes defectivos mostraran el mismo fenotipo. Del grupo de mutantes estudiados, varios de ellos exhibieron defectos fenotípicos muy similares en ambos macrófagos y *H. vermiformis*. A este locus se le designó *mip*. Estas observaciones mostraron que muchos de los aspectos moleculares de la infección intracelular de los macrófagos y protozoos son similares. Sin embargo, otro grupo de mutantes defectivos dentro de los macrófagos mostraron fenotipos distintos dentro de los protozoos y al locus defectivo se le denominó *mil* (55). Se ha postulado que *L. pneumophila*, ha evolucionado como un parásito de protozoos en el medio ambiente y la adaptación a esta primitiva fagocitosis intracelular fue suficiente para permitir que la bacteria sobreviviera y se multiplicara en el interior de células más evolucionadas como las de los mamíferos (56).

Otros factores bacterianos que promueven la infección intracelular y la virulencia son los loci de *L. pneumophila* designados como *dot* (*defect in organelle trafficking*) (57) y *icm* (*intracelular multiplication*) (53).

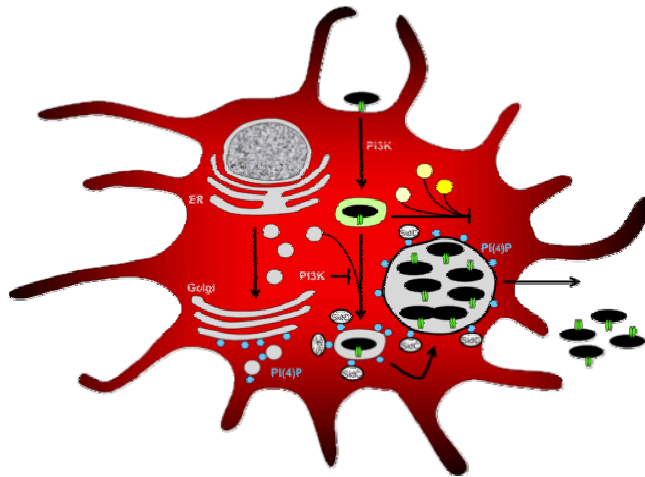


Figura 5. Esquema de la infección, multiplicación y liberación de *L. pneumophila*. <http://www.micro.biol.ethz.ch>

El análisis de la secuencia de aminoácidos de los genes *dot/icm*, confirman que existe transferencia de DNA por conjugación (58), mutantes defectivos en estos genes son defectivos en la apropiada maduración de los fagosomas de *L. pneumophila*, en la inducción de la apoptosis y en la formación de poro, cuando parasitan células de mamíferos.

Al final de la fase intracelular se producen un conjunto de cambios en la bacteria que le permiten adaptarse a los diferentes estadios del proceso que finaliza después de la multiplicación, adquiriendo una serie de características que le permitirán liberarse al exterior (inducción de la muerte celular por apoptosis) y reinfectar a otros macrófagos (resistencia a los ácidos, la expresión de flagelos y la citotoxicidad, entre otras).

### 1.5.2. Respuesta inmune frente a *Legionella*

En las infecciones del tracto respiratorio inferior, al igual que en otras localizaciones, el tipo de respuesta inmune e inflamatoria está condicionada por la naturaleza del agente infeccioso.

La inmunidad innata es capaz de reconocer una serie de componentes microbianos (PAMPs: *Pathogen associated molecular patterns*), compartidos por un gran número de patógenos, mediante la expresión de receptores codificados en el genoma. Los receptores reconocedores de patrones (PRR: *Pattern*

*recognition receptors*) pueden expresarse en la superficie celular, en compartimentos intracelulares o bien secretarse al torrente circulatorio u otros fluidos orgánicos. La función de estos receptores es la opsonización, activación del complemento y de las cascadas de la coagulación, fagocitosis, activación de señales proinflamatorias e inducción de apoptosis. Entre los receptores de patrones de reconocimiento destacan el receptor CD14, los *toll-like receptors*, asociados a la membrana, los *scavenger receptors* y los receptores de péptidos formilados, además de las proteínas Nod (*Nucleotide-binding oligomerization domain*), presentes en el citoplasma (59). Las señales intracelulares después de la fijación a los diversos receptores dan lugar a la translocación del factor NF- $\kappa$ B desde el citosol hacia el núcleo donde se une al DNA y actúa como promotor de múltiples genes de moléculas implicadas en orquestar la respuesta inflamatoria, tales como citocinas y quimiocinas que a su vez activan a los fagocitos (neutrófilos y macrófagos) y dan lugar a la activación de la respuesta inmune adaptativa, mediada por los linfocitos.

La entrada de los microorganismos en el tracto respiratorio desencadena la actividad del aparato ciliar epitelial respiratorio con la finalidad de eliminar el microorganismo. Esto estaría respaldado por la asociación epidemiológica entre la legionelosis y el tabaquismo, la enfermedad pulmonar crónica y el alcoholismo, condiciones que debilitan la función del sistema de depuración mucociliar.

#### 1.5.2.1 Inmunidad innata frente a *Legionella*

La respuesta inmune a *L. pneumophila* es similar a la inducida por otros microorganismos intracelulares oportunistas. Inicialmente posee una gran capacidad para infectar macrófagos y tiene una gran capacidad inmunoestimulante, dando lugar a sintomatología severa como consecuencia de la rápida estimulación de citocinas proinflamatorias. Los antígenos típicamente inmunoestimulantes son aquellos comunes a otros bacilos gramnegativos, como el lipopolisacárido, las *heat-shock proteins*, flagelos y fimbrias, que inducen la respuesta proinflamatoria (60).

En el curso de la infección por *Legionella* hay una primera fase de rápida multiplicación bacteriana en las células del huésped, con una reacción inflamatoria intersticial consistente en macrófagos, linfocitos B y células *natural killer*. Esta respuesta inicial limita el crecimiento de la bacteria en los macrófagos y citocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) y el interferón gamma (IFN $\gamma$ ) aumentan la actividad bactericida de los fagocitos.

La fagocitosis por los monocitos humanos es mediada por un sistema fagocítico de tres componentes compuesto por receptores del complemento C3 y la proteína de membrana externa mayor de superficie de *Legionella*. Si bien los monocitos sanguíneos pueden fagocitar *Legionella* en ausencia de anticuerpos específicos, la presencia de una opsonina específica mejora la fagocitosis. El papel desempeñado por los leucocitos polimorfonucleares en las defensas del huésped contra *Legionella* no se conoce con certeza. A diferencia de lo observado en los monocitos, el microorganismo no replica en el interior de los leucocitos polimorfonucleares. La destrucción de los macrófagos, las lesiones indirectas sobre las células epiteliales y el reclutamiento de neutrófilos y monocitos produce una neumonitis con un exudado rico en fibrina y células fagocíticas muy necróticas. La neumonitis puede ir acompañada de lesiones micronodulares, destrucción de la arquitectura pulmonar e incluso, en casos graves, de abscesos visibles macroscópicamente (61).

#### 1.5.2.2 Inmunidad específica frente a *Legionella*

Estudios *in vitro* sugieren que la inmunidad humoral desempeña un papel secundario en las defensas del huésped; por ejemplo, los anticuerpos no promueven la destrucción de *L. pneumophila* por los fagocitos (leucocitos polimorfonucleares, monocitos o macrófagos alveolares) y no inhibe la multiplicación intracelular en los monocitos y los macrófagos alveolares. Por otra parte, en pacientes con legionelosis pueden detectarse anticuerpos contra *Legionella* tipo específicos, por lo general del tipo IgM en una fase inicial e IgG en una fase posterior, en las primeras semanas después de la infección.

Además, los animales inmunizados muestran respuesta de anticuerpos específicos y resistencia a la reinfección por *Legionella* (62, 63). Los anticuerpos

séricos activarían la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos en las células del huésped (64).

En una segunda fase, la defensa inmunitaria frente a *Legionella* depende, fundamentalmente, de la inmunidad celular, en la que actúan como efectores finales los macrófagos activados por acción de los linfocitos Th1 (64) y es crucial el papel del IFN- $\gamma$ . La respuesta de tipo Th1 da lugar a funciones citotóxicas e inflamatorias, a diferencia de la respuesta Th2 que se asocia a la producción de anticuerpos. El IFN- $\gamma$ , como citocina Th1, inhibe selectivamente la proliferación de células Th2. En general, las células Th1 suelen mediar la protección contra patógenos intracelulares (mientras la protección contra los extracelulares está mediada por una combinación de Th2 y Th1). Así, este tipo de inmunidad es la misma que controla las infecciones por *Mycobacterium tuberculosis* y por *Leishmania*, entre otros microorganismos. La importancia de la inmunidad celular se evidencia con el hecho de que la legionelosis no es frecuente en enfermos con déficit humorales, déficit de complemento, ni en enfermos granulocitopénicos lo cual concuerda con las observaciones *in vitro* de que ni la opsonización ni la activación del complemento son letales para *L. pneumophila* que, por otra parte, parece que no es erradicada eficazmente por los neutrófilos.

La inmunidad mediada por células se manifiesta por la proliferación de linfocitos y la hipersensibilidad cutánea retardada a los antígenos de *L. pneumophila* en las dos primeras semanas después de la infección (63, 64). En pacientes y animales infectados, las células mononucleares responden a los antígenos de *L. pneumophila* con un aumento de la proliferación y la producción de citocinas activadoras de los monocitos como IFN- $\gamma$ , interleucina 1 (IL-1) y TNF- $\alpha$  (64). Las células citotóxicas naturales (*natural killer*) estimuladas por la IL-2 son capaces de destruir monocitos infectados por *L. pneumophila*. El TNF- $\alpha$  aumenta la resistencia de los macrófagos alveolares y los neutrófilos a *L. pneumophila* y media la liberación de IL-2 e IFN- $\gamma$  endógenos (65, 66). Los monocitos activados por el IFN- $\gamma$  reducen la tasa de multiplicación de *Legionella*, en parte mediante la reducción del hierro disponible para las



bacterias. Las características particulares de la respuesta inmune a *Legionella* condicionan, pues, el tipo de población susceptible y las manifestaciones clínicas de la infección.

### **1.6. Presentación clínica**

La infección por *Legionella* se puede manifestar con un espectro clínico muy variable que va desde formas asintomáticas, detectables por estudios de seroprevalencia, hasta una neumonía grave con fallo multiorgánico (67). La variabilidad clínica de esta infección depende probablemente de varios factores, como el tamaño del inóculo, la patogenicidad de la cepa, la forma de transmisión y los factores relacionados con el huésped. Las dos formas clínicas más frecuentes son: la fiebre de Pontiac y la neumonía (legionelosis).

#### **1.6.1. Fiebre de Pontiac**

No hay mucho acuerdo en la definición de la fiebre de Pontiac (68-70). Frecuentemente, el diagnóstico está basado en pruebas epidemiológicas, clínicas, microbiológicas y medioambientales. En el caso de la fiebre de Pontiac, las pruebas epidemiológicas y clínicas incluyen un episodio con un periodo corto de incubación, y una enfermedad con una corta duración de los síntomas, no fatal y sin neumonía, acompañada de malestar general, mialgias y fiebre. La edad y el tabaco no parecen ser factores de riesgo asociados a este síndrome. Hasta el momento no hay un acuerdo para determinar el período de incubación, ni los síntomas clínicos ni las especies de *Legionella* involucradas (68).

La fiebre de Pontiac está probablemente infradiagnosticada debido a su nula mortalidad y la baja especificidad de los síntomas, incluso todavía es tema de discusión si es producida o no por especies de *Legionella* (70). En una fracción importante de personas afectadas se ha probado la exposición a aerosoles contaminados por *Legionella* y el desarrollo de anticuerpos específicos. Sin embargo, el tiempo de incubación tan corto no permite una alta multiplicación de la bacteria ni en el pulmón ni en otras partes del cuerpo. Además, la ausencia de neumonía, la corta duración de la enfermedad y la completa recuperación sin necesidad de tratamiento antibiótico hace de *Legionella* un

agente responsable improbable. Se hipotetiza que la fiebre de Pontiac es probablemente producida por una exposición a una mezcla tóxica de microorganismos vivos y muertos, sus productos, incluyendo endotoxinas producidas por otras bacterias así como una baja de carga de *Legionella* vivas o muertas incapaces de producir neumonía (70). Sin embargo, la alta frecuencia de antigenuria positiva (36%) en el brote de fiebre de Pontiac de la ciudad de Oklahoma aportó evidencias de que el brote pudo ser debido a la inhalación de *L. pneumophila* serogrupo 1 y no por la inhalación de endotoxina de otras bacterias (69) .

### **1.6.2. Legionelosis**

La manifestación principal de la enfermedad del legionario es la neumonía. Esta enfermedad abarca un amplio espectro de manifestaciones clínicas que comprende desde tos leve con fiebre débil hasta un cuadro de estupor asociado con infiltrados pulmonares diseminados y fallo multiorgánico. El período de incubación de la legionelosis oscila entre 2 y 10 días. En una fase temprana de la enfermedad los pacientes refieren síntomas inespecíficos, como fiebre, malestar general, mialgias, anorexia y cefalea. En una fase inicial la tos es leve y escasamente productiva, con hemoptisis poco frecuente. El dolor torácico, de tipo pleurítico o no, puede ser una manifestación importante en algunos casos; si se acompaña de hemoptisis a menudo orienta hacia el diagnóstico erróneo de embolia pulmonar.

La diarrea se observa en el 25 al 50% de los casos; por lo general las heces son blandas y no sanguinolentas (1, 71, 72). Del 10 al 20% de los pacientes padecen náuseas, vómitos y dolor abdominal. Los síntomas neurológicos varían entre cefalea y letargia y un cuadro de encefalopatía. El síntoma neurológico más frecuente es confusión mental (73, 74).

En los casos típicos el examen físico del tórax revela rales en una fase temprana de la enfermedad y signos de condensación pulmonar. La bradicardia en relación con la fiebre es una manifestación sobrevalorada, pero puede observarse en ancianos con neumonía avanzada. La hipotensión se observó en el 17% de los pacientes con neumonía adquirida en la comunidad (73). En una

serie el 19% de los pacientes tenían fiebre de más de 40.5°C (75). Los escalofríos con temblores son más frecuentes en los pacientes con neumonía avanzada.

En estudios prospectivos comparativos, las manifestaciones clínicas generalmente eran similares en las neumonías causadas por *L. pneumophila* y las causadas por otros microorganismos (71, 76). Asimismo, las alteraciones en las pruebas funcionales hepáticas, hipofosfatemia, hematuria y alteraciones hematológicas, no son más frecuentes en la legionelosis que en la neumonía por otras causas. En cambio, la hiponatremia se observó con mayor frecuencia en la legionelosis (71, 75-77).

Aunque la presentación clínica no es específica, las siguientes manifestaciones deben orientar hacia el diagnóstico de legionelosis en un paciente con neumonía de causa desconocida: 1) alto número de neutrófilos y bajo de microorganismos en las secreciones respiratorias teñidas con Gram; 2) hiponatremia y 3) ausencia de respuesta al tratamiento con antibióticos betalactámicos y aminoglucósidos.

### **1.6.3. Infección extrapulmonar**

La legionelosis extrapulmonar es rara, aunque se han descrito algunos casos de celulitis, sinusitis, pancreatitis, peritonitis, pielonefritis y endocarditis por diseminación hematogena en pacientes inmunodeprimidos, con frecuencia sin infección pulmonar concomitante (78). Otra forma de presentación es la infección de herida quirúrgica por inoculación directa tras el lavado con agua contaminada. La localización más frecuente en estos casos es la infección de esternotomía, habiéndose descrito casos de pericarditis, miocarditis y endocarditis protésica (41).

Se ha descrito un caso de endocarditis por *Legionella* adquirida en el hospital por un paciente con una prótesis valvular cardíaca (79). Este paciente presentó un cuadro de fiebre, sudoración nocturna, malestar general y síntomas de insuficiencia cardíaca congestiva. La anemia es una manifestación frecuente cuya gravedad se correlaciona con la duración de la infección. A diferencia de la endocarditis provocada por otros microorganismos, la endocarditis por

*Legionella* no se asoció con episodios embólicos, presuntamente debido al escaso tamaño de las vegetaciones valvulares. Se comunicaron numerosos hallazgos, como coagulación intravascular diseminada, trombocitopenia, glomerulonefritis, erupciones cutáneas, neuropatías e insuficiencia hepática. Es posible que estas manifestaciones representen hallazgos inespecíficos relacionados con la gravedad de la infección, el tipo de enfermedad subyacente o los efectos secundarios del tratamiento farmacológico.

## **1.7. Diagnóstico**

### **1.7.1. Anatomía patológica**

Las alteraciones macroscópicas que caracterizan a esta enfermedad se limitan por lo general a los pulmones, que aparecen aumentados de peso y con consolidación lobulillar (bronconeumonía) o lobular. En más de la mitad de los casos se comprueba en la autopsia un derrame pleural, por lo general poco abundante y no hemorrágico.

Los hallazgos microscópicos pulmonares son muy semejantes a los de la neumonía lobular (neumocócica) clásica. Mediante tinciones especiales pueden verse numerosos bacilos en el interior de macrófagos y polimorfonucleares y algunos fuera de las células. Para dicha demostración suelen utilizarse la impregnación de plata de Dieterle o las tinciones de Wolbach o Giménez que, aunque no son específicas para esta bacteria, resultan altamente sugestivas en el contexto anatomopatológico adecuado. Las técnicas de identificación más específicas son la tinción con anticuerpos fluorescentes específicos y la hibridación *in situ* con sondas de DNA.

Sólo se ven microorganismos fuera del pulmón y los órganos torácicos en contadas ocasiones, siendo los lugares de afectación más frecuentes en dichos casos el hígado, el bazo, los ganglios linfáticos, la médula ósea, el endocardio y los riñones, lo que confirma la legionelosis como una enfermedad con potencial afectación multisistémica de diseminación hematógena.

### 1.7.2. Radiografía de tórax

En la mayoría de los casos, la primera radiografía de tórax es anormal, aunque en algunos casos raros de neumonía nosocomial los síntomas respiratorios y la fiebre preceden al infiltrado pulmonar radiológico (80). No obstante, la mayoría de los pacientes con legionelosis presentan alguna alteración radiológica hacia el tercer día de la enfermedad (81). En una fase temprana, el compromiso pulmonar generalmente es unilateral y afecta predominantemente a un lóbulo inferior. El infiltrado inicial típico es alveolar y puede ser segmentario/lobular o difuso y focal (82). Las zonas iniciales de aumento de densidad pueden consistir en nódulos redondeados y mal delimitados de base pleural y confundirse con zonas de infarto pulmonar. La zona de infiltración inicial a menudo progresa hacia una consolidación más extendida en el curso de algunos días.

Los derrames pleurales son frecuentes y en algunos casos raros se manifiestan antes del infiltrado en la radiografía (82). Los derrames pleurales asociados con legionelosis generalmente son de tamaño moderado y rara vez complican el manejo del paciente, aunque existe el riesgo de empiema. Se comunicaron algunos pocos casos de adenopatías hiliares y formación de neumatocele. En los pacientes inmunosuprimidos por un tratamiento de corticoesteroides no es infrecuente observar una cavitación y formación de abscesos (82). La cavitación puede aparecer hasta 14 días después de la presentación del paciente aún después de un tratamiento antibiótico adecuado y una respuesta clínica aparente. La ruptura de una cavidad en el espacio pleural con empiema o una fístula broncopleural resultante es una complicación rara.

La progresión de los infiltrados a pesar de un tratamiento apropiado es un hallazgo frecuente. La magnitud de la infiltración radiológica no se correlaciona bien con la gravedad del cuadro clínico ni con el pronóstico final. Existe una correlación significativa entre la gravedad radiológica y la presencia de *L. pneumophila* en el esputo (83). Es posible que la mayor cantidad de microorganismos en las secreciones respiratorias se asocie con más gravedad de la enfermedad expresada en la radiografía. La mejoría radiológica se observa

varios días después de la mejoría clínica. Los infiltrados radiográficos desaparecen en el curso de 1 a 4 meses.

## 1.8. Diagnóstico microbiológico

### 1.8.1. Examen microscópico

*L. pneumophila* aislada en esputo y pulmón es un cocobacilo de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de largo. Esta morfología es muy diferente de la observada de la bacteria aislada de cultivo, la cual es de bacilo filamentoso de 10 a 25  $\mu\text{m}$ . Menos del 0.1% de *L. pneumophila* presente en pulmón o esputo puede visualizarse utilizando la tinción de Gram. La forma presente en los tejidos humanos, es la forma intracelular de menor tamaño, la cuál cosa dificulta la visualización mediante tinción de Gram. Mediante la tinción de Giménez se aumenta considerablemente el número de bacterias detectadas en el esputo y en muestra de tejido de pulmón, se pueden visualizar de 100 a 1000 veces más que las visualizadas con la tinción de Gram. Aun así, esta tinción es menos sensible que la fluorescencia directa para la detección de *Legionella* en muestra de esputo (84). Se pueden observar ambas tinciones en la figura 6. Por el contrario, la tinción de Giménez es difícil de preparar, no está comercializada, requiere filtración antes de su uso, es bastante inestable y no es específica para *Legionella*.

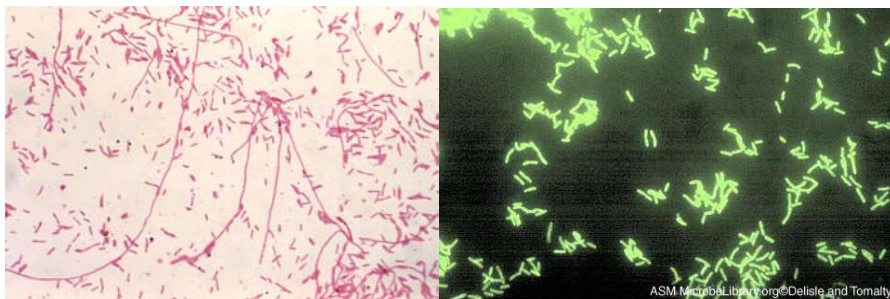


Figura 6. Fotografías de extensiones de *L. pneumophila* por tinción de Gram y fluorescencia directa. ASM.

La microscopía directa con anticuerpos fluorescentes es el método más sensible y específico para detectar *L. pneumophila* en tejidos y esputo (84). Además, es un método rápido y fue el primer método diagnóstico usado para detectar

*Legionella* en tejido pulmonar y secreciones respiratorias. La inmunofluorescencia directa es un procedimiento de tinción que permite detectar con rapidez la presencia de cualquier serogrupo de *L. pneumophila* en muestras clínicas. Esta técnica se realiza con un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer todos los serogrupos de *L. pneumophila*. Los anticuerpos, marcados con fluoresceína, se unen a los antígenos de la pared de *L. pneumophila*, un posterior lavado elimina los anticuerpos no fijados y al examinar la extensión con un microscopio de fluorescencia se puede observar la fluorescencia en la pared de estas bacterias.

Su realización está indicada cuando interese alcanzar un diagnóstico etiológico rápido en una neumonía sospechosa de estar causada por *Legionella*. La sensibilidad del método oscila entre el 25 y el 75% siendo la especificidad del 95%. Podemos obtener falsos positivos debidos a reacción cruzada de los anticuerpos monoclonales con otras bacterias, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacteroides fragilis*, *Staphylococcus aureus*, *Bordetella pertussis*, *Bacillus* spp.; el número de estas reacciones cruzadas dependerá de la experiencia del observador para distinguir la morfología de *L. pneumophila*. Los resultados deben ser interpretados con precaución, un resultado negativo no excluye la posibilidad de que el paciente esté infectado por *Legionella* y un resultado positivo debe interpretarse como un diagnóstico presuntivo. Por ello, actualmente no se recomienda su utilización como único método diagnóstico.

### **1.8.2. Cultivo e identificación**

El aislamiento de la bacteria en cultivo es considerado el método de referencia en el diagnóstico de la infección causada por *Legionella*. Es el único método disponible que permite detectar infecciones causadas por cualquiera de las especies y serogrupos de *Legionella* (aproximadamente 15-20 % de las infecciones se deben a especies o serogrupos diferentes de *L. pneumophila* serogrupo 1). Tiene como inconveniente el tiempo que tarda en crecer el microorganismo, de 3 a 10-12 días (85, 86) y su baja sensibilidad.

La sensibilidad del cultivo en muestras respiratorias oscila entre un 20 y un 80% y varía en función del tipo de muestra, siendo la especificidad del 100%. Esta baja sensibilidad se debe, entre otros, a los siguientes factores: la naturaleza de la bacteria que crece con dificultad aún en medios selectivos, la limitada supervivencia de la bacteria en las muestras clínicas, la aplicación de una terapia antibiótica previa a la toma de muestra y la experiencia microbiológica requerida para su aislamiento.

Aunque se puede considerar un método tedioso e incluso de difícil realización, es muy recomendable su utilización de forma rutinaria, ya que permite realizar posteriores estudios que ayudan a mejorar el conocimiento de la bacteria, como las investigaciones epidemiológicas para detectar las posibles fuentes de infección, o la realización de estudios de sensibilidad frente a antimicrobianos.

Las muestras recomendadas para realizar el cultivo de la bacteria incluyen secreciones respiratorias, tejido pulmonar y, en función del tipo y nivel de contaminación, pueden ser agrupadas en:

- Secreciones respiratorias contaminadas: esputo y muestras del tracto respiratorio inferior contaminadas con flora del tracto respiratorio superior, como aspirados, lavados o cepillados bronquiales.
- Secreciones respiratorias no contaminadas: muestras del tracto respiratorio inferior no contaminadas, como las obtenidas con cepillo telescópico y por aspiración pulmonar transparietal.
- Tejidos: tejido pulmonar obtenido por biopsia o necropsia, o tejido de otros órganos.
- Líquido pleural.
- Otras muestras menos frecuentes como el líquido cefalorraquídeo.

Para el cultivo de *Legionella* se utiliza un medio específico, BCYE $\alpha$  (*buffered charcoal yeast extract* suplementado con  $\alpha$ -cetoglutarato), que contiene los elementos requeridos por la bacteria, como hierro y cisteína. Se han utilizado algunos antibióticos, como la polimixina B, la oxitetraciclina, la anisomicina, el cefamandol, la vancomicina, etc., para añadir a la BCYE- $\alpha$ . Obtenemos así medios de cultivo selectivos como el GVPC o los BMPA- $\alpha$ , idénticos al BCYE- $\alpha$



con distintos suplementos de antibióticos y/o glicina añadidos. (87). Para el primer aislamiento las placas deben incubarse a 35-37°C, en condiciones de aerobiosis y humedad, y aunque el crecimiento de la bacteria generalmente empieza a ser visible a partir del tercer día de incubación, los cultivos se deben mantener en estas condiciones 10-12 días antes de considerarlos negativos. Pequeñas cantidades de CO<sub>2</sub> (2.5-5%) pueden favorecer el crecimiento de algunas especies. Cuando se procesan muestras contaminadas (esputo) se recomiendan tratamientos de descontaminación, ya que ayudan a eliminar la flora acompañante y favorecen el reconocimiento de las colonias de *Legionella*. Los tratamientos utilizados son de 2 tipos, calor (50°C 30 min) y tratamiento ácido (pH de 2.2 durante 5 min).

Aunque el género *Legionella* comprende más de 50 especies y más de 70 serogrupos, la mayoría de los cultivos recuperados de muestras de pacientes pertenecen a la especie *L. pneumophila*, siendo *L. pneumophila* serogrupo 1 el que se identifica con mayor frecuencia. Se debe tener en cuenta que mientras *L. pneumophila* crece bien en los medios de cultivo utilizados, no ocurre lo mismo con otras especies, que crecen con más dificultad, requieren más tiempo y, en ocasiones pueden llegar a perderse en subcultivos sucesivos.

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

También recientemente se han desarrollado métodos de secuenciación de fragmentos de genes, utilizando como dianas el gen 5S RNAr (88) y 16S RNAr (89) o el gen *mip* (90). La secuenciación de este último es más discriminativa en la identificación de especies de *Legionella* implicadas en infección humana.

### 1.8.3. Diagnóstico serológico

Desde el brote de Filadelfia, en el cual se utilizó la inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de anticuerpos en los pacientes afectados, se han desarrollado una variedad de pruebas para detectar anticuerpos específicos en muestras de suero, incluyendo microaglutinación y métodos de enzimoimmunoensayo (EIA), así como ensayos de hemaglutinación indirecta y contraímmunoelectroforesis. La IFI y el EIA han sido los métodos más utilizados durante años principalmente para *L. pneumophila* serogrupo 1. Las pruebas de microaglutinación presentan la ventaja de que por su facilidad de realización permiten ensayar un gran número de muestras a la vez, presentando una sensibilidad del 80% y una especificidad que oscila entre el 97 y 99%. Aunque el EIA es preferido por muchos laboratorios por su menor subjetividad y posibilidad de automatización (86, 91).

La IFI se realiza utilizando un sustrato antigénico de *L. pneumophila* serogrupo 1 inactivado con calor, o un *pool* conteniendo antígenos de varios serogrupos. Estos antígenos están comercializados, estandarizados y prefijados en los portaobjetos sobre los que se añaden diluciones seriadas del suero del paciente. La detección de anticuerpos en el suero del paciente se realiza mediante una reacción antígeno-anticuerpo que se revela con una antiglobulina humana marcada con fluoresceína, que permite la visualización de los microorganismos con un microscopio de fluorescencia. La sensibilidad de la IFI oscila entre 78-91%, siendo la especificidad del 99% (92, 93).

Para la determinación del título de anticuerpos en el suero de un paciente es preferible realizar un ensayo de IFI en sueros pareados, tomados en la fase aguda y convaleciente de la enfermedad, para demostrar una seroconversión (aumento del título al menos al cuádruple). Se considera positiva una seroconversión en la que el segundo suero presente un título  $\geq 1/128$ . La seroconversión se produce en alrededor del 70-80% de los casos confirmados con cultivo, se puede producir en la primera semana tras el inicio de los síntomas, aunque también puede requerir de 6 semanas a 2 meses en aparecer, e incluso no producirse.

Cuando se cuenta con un suero único la interpretación de los resultados es más compleja, ya que el nivel de anticuerpos de la población general puede variar de unos lugares a otros, y en general este nivel no se conoce. Por ello, títulos superiores a 1/256 son sugerentes de enfermedad reciente o pasada, pero títulos inferiores a este valor deben considerarse negativos. Por otro lado, un resultado negativo no descarta la enfermedad, ya que en ocasiones se han detectado fallos en la producción de anticuerpos. Para aumentar la sensibilidad es importante utilizar reactivos que detecten inmunoglobulinas totales (IgG, IgM e IgA).

Aunque la IFI ha sido una herramienta diagnóstica de gran utilidad, las limitaciones que presenta y el tiempo requerido para obtener los sueros pareados, hacen que en los últimos años haya disminuido su uso, sin embargo es de gran utilidad para realizar diagnósticos retrospectivos y en investigaciones epidemiológicas.

#### **1.8.4. Detección de antígeno de *L. pneumophila* en muestras de orina**

En el transcurso de un episodio neumónico por *L. pneumophila* se libera antígeno específico que puede detectarse en la orina (94). La detección de este antígeno ofrece un diagnóstico rápido de confirmación de neumonía por *L. pneumophila* reciente o pasada, por lo que estos ensayos se deben realizar en presencia de un cuadro clínico compatible, o con menor sospecha clínica en el caso de brotes hospitalarios. Estas técnicas han revolucionado el diagnóstico de esta enfermedad y han mostrado ser extraordinariamente útiles, ya que permiten la detección de un mayor número de casos y la aplicación de un tratamiento antibiótico específico en las fases iniciales de la enfermedad (77, 95). También permiten el reconocimiento temprano de brotes epidémicos, favoreciendo una rápida respuesta en la aplicación de medidas preventivas.

En Europa, el número de casos diagnosticados por estas técnicas ha sufrido un aumento desde 1998. En 1995, representaban un 15% de los casos diagnosticados; en 1998 aumentó hasta el 33%, en 2004 al 74% y en 2006 más del 90% del total de casos. El antígeno detectado es un componente

soluble del LPS de la pared celular de *Legionella*, es termoestable (96), y es detectable desde el inicio de la sintomatología, y en algunos casos hasta muchos meses después (en algún caso hasta más de 1 año), no viéndose los resultados claramente influenciados por la administración previa de antibióticos.

Estos antígenos se han detectado por varias técnicas, como aglutinación con partículas de látex, hemaglutinación pasiva y radioinmunoensayo (RIA). La primera técnica disponible comercialmente que demostró ser una técnica útil, sensible y específica, fue el RIA, que presentaba una sensibilidad del 60% en orina directa y del 80% en orina concentrada, siendo la especificidad en ambos casos del 100%. La utilización de la técnica del RIA exigía disponer de instalaciones adecuadas para trabajar con isótopos radioactivos, por lo que ha sido sustituida por técnicas de EIA de similares características, que se han incorporado a muchos laboratorios (97).

Actualmente, se dispone también de técnicas de inmunocromatografía (ICT) más rápidas, que ofrecen resultados en 15 minutos o menos dependiendo de la concentración de antígeno en la orina. Se caracterizan porque son menos complejas que las técnicas de EIA, no requieren equipamiento específico y se realizan de forma individualizada. Los resultados obtenidos son equiparables con los de las técnicas de EIA en sensibilidad y especificidad, exhibiendo específicamente una buena concordancia global con el EIA (86, 98).

Todas las técnicas descritas detectan con una gran sensibilidad el antígeno de *L. pneumophila* serogrupo 1, siendo además capaces de detectar *in vitro* antígeno soluble de todos los serogrupos de *L. pneumophila*. El EIA de Biotest es el único, que según el fabricante, tiene capacidad para detectar todos los serogrupos de *L. pneumophila*, así como otras especies de *Legionella*, aunque no garantiza la misma sensibilidad para todos los serogrupos y especies (99, 100), aunque en algunos estudios se ha visto que otros EIA como el de Binax muestra mayor sensibilidad que este para detectar otros serogrupos (101). La capacidad de detectar antígeno de otros serogrupos está en función de las características propias de cada antígeno, así como en la capacidad de pasar a la orina, la cantidad excretada y su inmunogenicidad. Los antígenos de otros

serogrupos de *L. pneumophila* podrían no excretarse por la orina, ya que pueden pasar a través de las paredes de los capilares glomerulares o no hacerlo, en función de su tamaño y de su carga.

Es importante conocer que la concentración del antígeno presente en la orina por ultrafiltración selectiva incrementa significativamente la sensibilidad sin que se vea afectada la especificidad. En algunos estudios se aumenta la sensibilidad hasta en un 30% (102, 103). Las técnicas de detección de antígeno en orina son muy específicas, en el rango del 90-99%. Un falso positivo puede ser debido a factores reumatoides, procesos de congelación-descongelación y por elevado sedimento urinario. El tratamiento térmico de la orina no supone la desaparición de la positividad y sí la eliminación de estos falsos positivos en muestras negativas. En la tabla 2, se muestra la sensibilidad y la especificidad de las diferentes técnicas.

### **1.8.5. Detección de *Legionella* en muestras clínicas por técnicas de amplificación genética**

El aislamiento en cultivo de *L. pneumophila* permite la realización de posteriores estudios de caracterización con fines taxonómicos y epidemiológicos. Pero el aislamiento no siempre es posible debido a toda una serie de factores como son: la pérdida progresiva de viabilidad de la bacteria tras la toma de muestra, el enmascaramiento de las colonias cuando se procesan muestras contaminadas (esputo), donde el éxito en el aislamiento de la bacteria está correlacionado con el número de estos microorganismos presentes en la muestra y el tiempo requerido para la obtención de los resultados, que en ocasiones es alto.

Para intentar evitar estos inconvenientes, en los últimos tiempos, se han desarrollado métodos diagnósticos basados en la detección de DNA de *Legionella* en muestras humanas, utilizando métodos de hibridación con sondas génicas específicas o basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La reacción de PCR consiste en la amplificación *in vitro* de DNA o RNA mediante la acción de una DNA polimerasa termorresistente (Taq polimerasa), a partir de una secuencia definida de una cadena de DNA utilizada como punto de inicio.

Aunque estas técnicas han revolucionado en los últimos años el campo diagnóstico de las enfermedades infecciosas debido a su gran rapidez, sensibilidad, especificidad y versatilidad, sin embargo, en el caso de *Legionella*, los primeros ensayos no cumplieron las expectativas y en alguna ocasión una vez comercializados fueron retirados del mercado. A pesar de estos inicios poco prometedores, se han desarrollado métodos dirigidos principalmente a tres dianas del cromosoma bacteriano: el gen *mip* (90, 104) y los genes 5S RNAr (105, 106) y 16S RNAr (107, 108). Los productos de amplificación se detectan mediante la visualización de los amplicones con bromuro de etidio tras su separación en geles de agarosa, mediante hibridación con sondas específicas o mediante secuenciación.

Sin embargo, uno de los principales inconvenientes de la PCR convencional es que se trata de un método cualitativo, por lo que el empleo de diferentes sondas marcadas con fluoróforos en un sistema de PCR a "tiempo real" está desplazando el uso de la PCR convencional. Este método permite la cuantificación del número de células presentes en la muestra, y además reduce el riesgo de contaminaciones y el tiempo requerido en el procesamiento de las muestras, eliminando la necesidad de un análisis posterior de los amplicones obtenidos. Si a esto se añade la posible utilización de una PCR múltiple que además de detectar *L. pneumophila* permita la detección simultánea de otros microorganismos causantes de neumonía, como *Chlamydomphila pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae*, el valor de esta metodología se podría ver muy incrementado en el diagnóstico etiológico de las neumonías atípicas adquiridas en la comunidad.

La aplicación de la PCR en muestras extrarespiratorias parece bastante atractiva sobretodo en aquellos pacientes que no producen esputo. La detección de DNA de *Legionella* en muestras de suero tiene una sensibilidad baja (30-60%) en pacientes con legionelosis (109) pero ligeramente más alta (70-90%) en pacientes con enfermedad severa (110). Cuando se procesan muestras del tracto respiratorio inferior la PCR muestra una sensibilidad igual o superior al cultivo (107, 111, 112). Sin embargo, estos ensayos basados en la PCR todavía muestran muchos falsos positivos (85, 112), y es difícil diferenciar si es un

realmente un falso positivo o una falta de sensibilidad de la técnica de referencia.

A esto hay que añadir la presencia de inhibidores en las muestras clínicas, como hemoglobina, urea o heparina, que pueden dar lugar a la aparición de falsos negativos debidos a inhibición de la amplificación, por lo que es fundamental la preparación de la muestra de modo que se eliminen eficazmente estos inhibidores y de la inclusión de controles internos de amplificación.

Tabla 2. Diagnóstico microbiológico de la legionelosis

Método diagnóstico	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Cultivo esputo	20-80	100
IFD Espudo	25-75	95-99
Serología	70-90	99
Antígeno urinario	80-90	98-100

### 1.9. Marcadores de inflamación

En los últimos años se ha demostrado la utilidad de la determinación de los marcadores de inflamación para establecer el diagnóstico y el pronóstico de las infecciones respiratorias (113). Las proteínas de fase aguda y las llamadas *hormokines* aumentan en suero en respuesta a citocinas proinflamatorias, mostrando patrones diferentes en función del patógeno implicado.

En la neumonía por *Legionella* hay, pues, un predominio de la producción de citocinas que definen la actividad celular Th1 como el IFN- $\gamma$  y la IL-12 (114). Como consecuencia, se encuentran elevados en suero los marcadores que son inducidos por el IFN- $\gamma$ , como un marcador indirecto de la actividad de los linfocitos T citotóxicos (115), tales como la neopterinina (116). Otros marcadores ya clásicos de infección bacteriana, como la proteína C reactiva o la más reciente procalcitonina (PCT), se encuentran menos elevados en la neumonía por *Legionella* con respecto a otras etiologías como la neumocócica (116). De hecho, la producción de PCT es inhibida por el IFN- $\gamma$  (117). Sin embargo, los niveles de PCT tienen valor pronóstico, siendo más elevados en pacientes con neumonía por *Legionella* con criterios de severidad y evolución desfavorable (118, 119). Por otro lado, la determinación de niveles de marcadores

cardiovasculares como el péptido natriurético atrial tiene valor pronóstico sin influencia del agente etiológico (120).

### **1.10. Tratamiento**

La legionelosis fue considerada por muchos como una plaga por su elevada mortalidad, aunque se debe tener en cuenta que los primeros casos eran pacientes con enfermedad severa y que no recibieron el tratamiento antibiótico adecuado. Actualmente, la mortalidad ha disminuido con el aumento de su sospecha por parte de los clínicos, tratamiento empírico temprano y eficaz contra *Legionella* y la incorporación de técnicas de diagnóstico rápido. Un retraso en el inicio del tratamiento antibiótico adecuado está asociado con un aumento de la mortalidad (121). En un estudio del CDC muestran una disminución en la mortalidad de la neumonía adquirida en la comunidad por *Legionella* del 26 al 10% en el periodo de 1980-1998 (122). En recientes estudios con pacientes que fueron diagnosticados por técnicas rápidas (detección de antígeno) muestran unos ratios de mortalidad de 0%-5.5% (123-125).

*Legionella* es un patógeno intracelular, y los antibióticos capaces de alcanzar altas concentraciones intracelulares se asocian con una mayor probabilidad de eficacia en seres humanos que los agentes con escasa penetración celular (126). La susceptibilidad de *Legionella* a los distintos antibióticos no ha sido estandarizada, pero se acepta que los modelos intracelulares en estudios *in vitro* o con animales de laboratorio son más adecuados que las pruebas de dilución en agar o medio líquido (127). Los estudios en cultivos celulares confirman que los macrólidos, las quinolonas, las rifampicina, la trimetropim-sulfametoxazol y las tetraciclinas son antibióticos eficaces contra *Legionella*. La mayor eficacia de estos antibióticos respecto a betalactámicos y aminoglucósidos posiblemente se debe al mayor poder de penetración de estos en las células fagocíticas.

Los nuevos macrólidos (azitromicina y claritromicina) y las fluoroquinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino) son los fármacos de elección para el tratamiento



de la legionelosis (128). La eritromicina ha sido reemplazada por otros macrólidos debido a su actividad reducida *in vitro* y en modelos intracelulares animales. También, se asocia con más frecuencia de efectos adversos que los nuevos macrólidos, como ototoxicidad, manifestaciones gastrointestinales y tromboflebitis en el lugar de administración venosa.

La azitromicina y las fluoroquinolonas pueden utilizarse en pacientes inmunocompetentes con legionelosis comunitaria u hospitalaria (82). A pesar de los avances obtenidos con el uso de las quinolonas, la legionelosis sigue teniendo un mal pronóstico en pacientes gravemente inmunodeprimidos, graves o en los que ha existido retraso en el inicio de un tratamiento antibiótico adecuado en los que la mortalidad puede alcanzar el 20%. En estos pacientes se describe puntualmente el beneficio del uso de una terapia combinada mediante levofloxacin y azitromicina.

La administración debe ser inicialmente intravenosa hasta que el paciente quede apirético, y posteriormente oral hasta cumplir entre 10 y 21 días en función del fármaco escogido y la situación inmunológica del paciente. En el caso de la azitromicina son suficientes entre 5 y 10 días en el paciente inmunocompetente y es válida la administración de varias tandas de 3 días de duración a intervalos de 15-20 días en el caso del enfermo inmunodeprimido. El retraso en la administración del tratamiento antibiótico adecuado afecta negativamente al pronóstico de la enfermedad (71, 121, 129).

### **1.11. Prevención y control de la legionelosis**

La enfermedad por *L. pneumophila* es de declaración obligatoria desde el año 1997, y los esfuerzos para su control se basan en la adopción de medidas higiénico-sanitarias recogidas en guías y en la legislación. Las primeras legislaciones en España se publicaron a partir de 1998, sobretodo a raíz del brote de Alcalá de Henares en 1996. El Ministerio de Sanidad y Consumo publicó, en ese año el primer Real Decreto de prevención y control de la legionelosis. En la elaboración de esta legislación participaron las Comunidades Autónomas, así como expertos y técnicos con experiencia en el control de la

legionelosis, y se establecieron los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis.

La legionelosis se puede considerar una enfermedad emergente, producida por un microorganismo que se ha visto favorecido por las actuales condiciones de vida (sistemas de abastecimiento de agua de las ciudades, instalaciones de agua doméstica y otras instalaciones que requieren agua para su funcionamiento, como las torres de refrigeración). Además, la legionelosis tiene una elevada repercusión mediática debido al hecho de que se asocia a brotes comunitarios, normalmente relacionados con torres de refrigeración, agua caliente sanitaria, jacuzzis, fuentes ornamentales y nebulizadores.

El diagnóstico rápido y correcto de las infecciones por *L. pneumophila*, permite la rápida instauración del tratamiento adecuado, que mejora el pronóstico de los pacientes, y alerta sobre la presencia de *Legionella*, poniendo en funcionamiento los mecanismos de investigación epidemiológica que acaban muchas veces controlando el foco ambiental.

Para evitar la aparición de brotes epidémicos, se emplean por una parte, métodos de erradicación cuando se producen casos o brotes asociados a un edificio y por otra parte, métodos preventivos, que posibilitan el mantenimiento de la concentración de la bacteria dentro de unos límites (preferiblemente por debajo de los límites de detección de las técnicas de aislamiento utilizadas), y que están resultando ser eficaces a raíz del desarrollo de la ingeniería sanitaria y la mejora en el diseño de aparatos e instalaciones.

### **1.11.1. Métodos preventivos**

Cuando se estudia el control de la presencia de *L. pneumophila* surgen cuestiones sobre dónde, cuándo y cómo actuar. Es bien conocida la ubicuidad de *Legionella* en ambientes naturales como lagos y ríos. La concentración de *Legionella* en estas aguas es generalmente muy baja, por esto, y a pesar de las aerosolizaciones que deben tener lugar en saltos de agua naturales por ejemplo, nunca se ha descrito ningún caso de legionelosis asociado a esta exposición. En ausencia de casos, el control del medio ambiente natural sería no solamente inútil, sino también extremadamente caro. La única excepción a

esta regla pudiera ser la contaminación de balnearios de aguas termales, si éstos se pueden considerar ambiente natural (130).

Es precisamente en ciertos ambientes creados por el hombre donde se hace necesario el control de *Legionella*, para ello en muchos países se han elaborado normas para la prevención de la legionelosis que controlan dos fases de actuación, por una parte durante el montaje y diseño de los sistemas y por otra durante la fase de explotación de las instalaciones, mediante un mantenimiento adecuado. En España a raíz de los grandes brotes de legionelosis ocurridos, se publicó un Real Decreto 865/2003, de 4 de julio, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis, además de legislaciones de comunidades autónomas, en el caso de Cataluña existe el Decreto: "Decret 352/2004, de 27 de juliol, pel qual s'estableixen les condicions higienicosanitàries per a la prevenció i el control de la legionel·losi." Las medidas contenidas en este Real Decreto se aplicarán a las instalaciones que utilicen agua en su funcionamiento, produzcan aerosoles y se encuentren ubicadas en el interior o exterior de edificios de uso colectivo o instalaciones industriales que puedan ser susceptibles de convertirse en focos para la propagación de la enfermedad: sistemas de agua caliente sanitaria y sistemas de agua fría de consumo humano.

### **1.11.2. Torres de refrigeración**

Las torres de refrigeración (figura 7) están relacionadas con muchos casos de legionelosis (131) ya que son un excelente amplificador y diseminador de *Legionella*, debido a que reúnen una serie de condiciones apropiadas para ello, como son la elevada temperatura del agua (28-38°C, sobre todo en verano), la humedad, el incremento en la tensión de oxígeno en las superficies agua-aire y la acumulación de nutrientes (132-135).



Figura 7. Esquema de una torre de refrigeración. [www.athisa.es](http://www.athisa.es)

Miller y Kenepf (1994), estudiaron la presencia de *Legionella* en un total de 1.152 torres de refrigeración, en un período de 4 años (1988-1991), encontrando un 51% de torres contaminadas en 1988, 30% en 1989-90 y 17% en 1991, siendo identificados todos los aislados como *L. pneumophila*, y encontrándose en muchos casos un número muy elevado de esta bacteria (alrededor de 105 ufc/mL).

Muchos países han producido directivas o guías para el control de la legionelosis en las torres de refrigeración. En España, la norma UNE 100-030- y el Real Decreto 865/2003 proporcionan una serie de pautas sobre las acciones preventivas a realizar en el caso de las torres de refrigeración, que en líneas generales consistirán en situar estos aparatos en lugares aislados lejos de zonas frecuentadas, colocándolos a sotavento en relación con los vientos predominantes en la zona de emplazamiento, y de fácil limpieza. Además se recomienda el tratamiento de estos equipos con compuestos químicos anticorrosivos, agentes que disminuyan la concentración de depósitos calcáreos y un sistema permanente de tratamiento por medio de agentes biocidas.

El análisis periódico de la presencia de *Legionella* y los resultados negativos encontrados no deben sustituir un buen sistema de mantenimiento de las torres. De hecho en uno de los brotes más relevantes del Reino Unido, el caso

de Staffordshire (136), las torres implicadas en la diseminación de *L. pneumophila* eran controladas rutinariamente, analizándose en ellas la presencia de *Legionella*. Sin embargo, aunque las limpiezas cuidadosas a intervalos regulares ayudan a controlar la concentración de *Legionella*, reduciendo considerablemente los recuentos, se ha comprobado que al cabo de cierto tiempo *Legionella* vuelve a proliferar, por lo que se hace necesario incluir tratamientos suplementarios con biocidas. La eficacia de los biocidas en este campo, también ha sido evaluada, encontrándose que los biocidas no oxidantes tioéter fenólico clorado y bromocloro difenil hidantoína, no son tóxicos, son biodegradables y resultan eficaces en el control de *Legionella* en torres de refrigeración (137).

### **1.11.3. Redes internas**

Respecto a los sistemas internos de agua potable de hoteles, hospitales y centros sociosanitarios, han sido también muy numerosos los brotes epidémicos descritos asociados a estos edificios (69, 138-140). Los sistemas de agua caliente con temperaturas entre 30 y 45°C, son la causa más común de legionelosis, ya que favorecen el crecimiento de *Legionella*. La norma UNE 100-030-01, describe el adecuado diseño y montaje en las instalaciones de agua sanitaria. Los sistemas deberán carecer de tramos ciegos y derivaciones innecesarias por las que el agua circule con dificultad, debiéndose evitar la utilización de materiales que sirvan de sustrato para el crecimiento de *Legionella*. Se deberá realizar una limpieza periódica de los sistemas de agua doméstica para prevenir la acumulación de sedimentos y microorganismos. El agua caliente deberá almacenarse a 60°C y como mínimo a 50°C, mientras que el agua fría almacenada y distribuida debe mantenerse por debajo de 20°C. Para determinar si el mantenimiento es correcto se deberán realizar controles físico-químicos y microbiológicos.

En resumen, los métodos para limitar o prevenir el crecimiento de *Legionella* están basados en el conocimiento de los factores que potencian el crecimiento de la bacteria. Evitando estos factores y manipulando apropiadamente los sistemas de agua domésticos es posible evitar la aparición de la enfermedad.

Las Autoridades Sanitarias aconsejan que en instalaciones a las que se asocie la aparición de casos, se apliquen métodos de erradicación en los que las medidas de limpieza y desinfección serán más extremas que las descritas en las medidas preventivas.

La Norma UNE 100-030-01 establece que en el procedimiento para la desinfección de los sistemas de agua fría y caliente, los tanques deben ser hiperclorados con 20-30ppm de cloro durante al menos 3h, asegurando que llega cloro a los puntos de salida, seguido de vaciado, limpieza y rellenado. La temperatura del agua debe estar en todo momento por debajo de 30°C. El Real Decreto 865/2003, en cuanto a los sistemas de agua sanitaria caliente y fría, establece en su anexo 3, que se realizará una limpieza y desinfección de las instalaciones al menos una vez al año.

En caso de la aparición de un brote de legionelosis, el Real Decreto 865/2003, establece en las instalaciones de agua sanitaria fría y caliente, una actuación de choque sobre la red mediante desinfección con cloro (20-30 ppm de cloro residual libre durante 2-3 h) o alternativamente mediante desinfección térmica.

#### **1.11.4. Medidas de desinfección complementarias**

Cuando se intenta una desinfección continuada del sistema se deben introducir una serie de medidas complementarias a la hipercloración y al choque térmico. Estos métodos son especialmente recomendables para el circuito de agua sanitaria caliente de centros. Las podemos separar en dos tipos:

##### *Desinfección local.*

- A) Sistema de hipercloración instantáneo (141)
- B) Luz ultravioleta (142)
- C) Filtros bacterianos. Se instalan a la salida del agua (duchas o grifos)

##### *Desinfección general.*

- A) Cloración continua (143-145)
- B) Cloración discontinua (146)
- C) Ionización cobre/plata. (145, 147-149)

### **1.12. Estudio de Brotes**

Una de las características de la legionelosis, más allá de la gravedad y consecuencias de la propia infección sobre la salud del paciente, es su gran impacto mediático. Desde el mismo momento de la descripción de *L. pneumophila* como agente causal, en la convención de legionarios norteamericanos, los medios de comunicación recogieron y difundieron profusamente detalles relativos al brote que, en aquellos momentos, suponía un reto y una sorpresa en un tiempo en el que existía una confianza muy grande en cuanto a la capacidad humana para vencer las enfermedades infecciosas. Esta misma tendencia mediática se prolongó en el tiempo y en el espacio. Nuestro país no ha sido una excepción y, poco después de la descripción inicial del agente causal, aparecieron en la prensa los primeros casos de turistas que habían contraído la infección en establecimientos hoteleros de nuestras costas. En los años sucesivos se han venido produciendo brotes más o menos extensos en nuestros hospitales. Sin embargo, han sido los brotes comunitarios los que, por su extensión, han tenido una mayor repercusión sobre los medios de comunicación y, como consecuencia de ello, también sobre la propia sociedad que los ha sufrido. Con el trascurso del tiempo, el diagnóstico y la atención de los pacientes con legionelosis se han familiarizado en nuestros hospitales, incluyendo a aquéllos de ámbito regional o comarcal. Cuando aparece un brote comunitario de legionelosis en el área de influencia de éstos, se produce una gran conmoción social que añade complejidad a la propia atención sanitaria de los pacientes.

Durante el período 1989-2005, se notificaron a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica un total de 310 brotes de legionelosis con 2.974 casos implicados. De los 310 brotes mencionados, 228 (2.560 casos) tuvieron lugar en el ámbito comunitario, otros 33 brotes (197 casos) se produjeron en pacientes mientras estaban ingresados en centros hospitalarios (brotes nosocomiales) y 49 brotes (217 casos) se dieron en turistas extranjeros de viaje en España.

La investigación de brotes de legionelosis requiere una compleja coordinación y la colaboración de equipos multidisciplinares, que incluyen desde clínicos y

microbiólogos a epidemiólogos, técnicos en medio ambiente, medios de comunicación, asociaciones de vecinos y autoridades políticas. Según la normativa vigente en Cataluña, la sospecha de brote (diagnóstico de dos o más casos relacionados en el tiempo y/o el espacio) se debe notificar urgentemente durante las primeras 24h (150) a la unidad de vigilancia epidemiológica que corresponda, mediante los medios más rápidos de los cuales se disponga (telemática).

Es importante que desde el primer momento de la investigación se cuente con la colaboración de los técnicos de sanidad ambiental, ya que el objeto principal de la investigación es identificar la fuente de exposición ambiental para poder tomar las medidas adecuadas.

Por tal de sistematizar la recogida de datos para la investigación del caso, se utiliza una ficha epidemiológica. En esta ficha además de los datos del paciente y del médico responsable, deben constar datos clínicos, diagnósticos, evolución del caso, datos epidemiológicos sobre la posible fuente de infección, si es un caso nosocomial o comunitario y si se trata de un caso asociado a brote o esporádico.

### **1.12.1. Investigación de brotes comunitarios**

Desde un punto de vista epidemiológico, se considera brote epidémico cuando se detectan dos o más casos relacionados epidemiológicamente. Es necesario realizar un estudio para identificar los lugares donde se ha podido contraer la enfermedad, investigar la aparición de otros casos relacionados durante los 6 meses anteriores, confirmar el diagnóstico y, en el caso de que este asociado a un edificio de uso colectivo se tiene que valorar la revisión de las instalaciones. Para identificar la fuente de infección es necesario obtener una descripción detallada de los lugares donde el paciente ha estado durante los 10 días anteriores al inicio de los síntomas.

En el momento de diseñar la investigación epidemiológica de un brote comunitario de legionelosis, se tiene que tener en cuenta que este se puede producir: en edificios de uso colectivo (los enfermos han vivido, visitado o



trabajado en un edificio en los 10 días anteriores a la aparición de síntomas) o no relacionados con un edificio.

Si se determina que hay algún edificio o instalación que pueda ser el origen del brote, se inspeccionarán las instalaciones sospechosas y se recogerán muestras ambientales que se analizarán en los laboratorios de referencia. En cualquier caso, se tiene que garantizar que todas las instalaciones sospechosas de ser la fuente de infección cumplen la normativa y las recomendaciones técnicas, tanto en el mantenimiento como en los tratamientos de limpieza y desinfección.

### **1.12.2. Investigación de brotes nosocomiales**

Un brote de legionelosis nosocomial se define como “la aparición de dos o más casos de legionelosis relacionados epidemiológicamente en un recinto hospitalario o socio-sanitario”. La aparición de un brote hospitalario se debe generalmente a la amplificación de *Legionella* presente en el sistema de agua sanitaria o más raramente de las torres de refrigeración.

Se deberá constituir un grupo directivo para el estudio del brote, en el que participarán miembros del Servicio de Microbiología, Medicina Preventiva, Neumología, Enfermedades Infecciosas y Mantenimiento del centro. Se tienen que revisar la exposición de los pacientes a las posibles fuentes hospitalarias de riesgo (ducha, ingestión, gargarismos y/o higiene de la boca con agua del grifo), las prácticas del personal sanitario (uso del agua del grifo para equipos de terapia respiratoria y lavados de sonda nasogástrica) y los procedimientos del servicio de Mantenimiento (aspectos relacionados con el circuito de agua sanitaria y torres de refrigeración).

### **1.12.3. Toma y análisis de muestras ambientales**

Las muestras deben recogerse siempre antes de realizar cualquier tratamiento desinfectante de los puntos más distales de los circuitos donde frecuentemente no se alcanzan las temperaturas deseadas, los depósitos, las cisternas o las bandejas de almacenamiento, preferiblemente de sus partes bajas, o de puntos ciegos o codos (figura 8) donde es poca la circulación del agua y abundan los biofilms.



Figura 8. Fragmento de tubería con biofilms.  
[www.Legionella-water-treatment.co.uk/](http://www.Legionella-water-treatment.co.uk/)

El agua que se recoge de grifos debe tomarse siempre antes de hacerla circular, y sobre todo deben recogerse muestras con torundas de algodón para intentar recoger muestra de los biofilms (151).

Para el cultivo será necesario un litro de agua para concentrar la muestra por filtración, 200 ml para concentrar la muestra por centrifugación ó 0.1 ml como mínimo para realizar la siembra directa. Para técnicas moleculares dependerá también del procedimiento concreto que se quiera aplicar. En el momento de la toma de muestra es esencial registrar la temperatura del agua y el cloro. Si la muestra lleva cloro, debe tomarse con tiosulfato sódico para neutralizarlo con el fin de evitar que continúe la acción bactericida de éste durante el transporte y reproducir el contenido microbiológico del agua en el momento de la recogida.

El cultivo es el método más universal para la detección de *Legionella* en muestras ambientales. Las aguas con bajas concentraciones requieren ser concentradas previamente a la siembra. Existen dos posibilidades de concentración de la muestra: filtración a través de membranas y centrifugación. Siempre deben llevarse a cabo junto con la siembra directa posconcentración, tratamientos descontaminantes para eliminar el resto de flora microbiana acompañante. Estos tratamientos consisten en un tratamiento térmico y/o un tratamiento ácido. Estos tratamientos ocasionan una reducción importante en el número de legionelas que se detectan, esto debe tenerse en cuenta a la hora de evaluar los resultados (152).

#### **1.12.4. Tipaje molecular de *Legionella***

Las cepas de *Legionella* aisladas de muestras clínicas o ambientales en el transcurso de un brote, han de ser analizadas para identificar la fuente de

infección y establecer una asociación epidemiológica. La ubicuidad de *Legionella* spp. en ecosistemas acuáticos dificulta establecer un nexo epidemiológico entre cepas aisladas en diferentes nichos ecológicos y las cepas aisladas en los pacientes. Por este motivo, para discernir cuales de ellas pertenecen a una misma población clonal nos obliga a aplicar sistemas de tipificación epidemiológica.

Las primeras investigaciones dirigidas a enfrentar cepas clínicas con cepas ambientales de *Legionella* se basaban en la determinación del serogrupo (153). Pero la mayoría de aislados pertenecen al serogrupo 1, y por tanto la identificación del serogrupo ha dejado de ser un marcador epidemiológico.

Se han utilizado diferentes métodos para determinar la variabilidad intraespecífica de las especies de *Legionella* en estudios epidemiológicos. Estos sistemas se basan en métodos fenotípicos, basados en la detección de características expresadas por el microorganismo, y genotípicos, a partir del análisis de DNA cromosómico y/o elementos genéticos extracromosómicos.

#### *1.12.4.1 Métodos fenotípicos*

Estos métodos analizan las características bioquímicas, inmunológicas o proteicas de las cepas de *Legionella* aisladas.

#### Tipificación con anticuerpos monoclonales. Serotipificación

Microinmunofluorescencia con un panel de anticuerpos monoclonales (154) capaces de diferenciar modificaciones menores en la superficie celular bacteriana. Se trata de una técnica simple y rápida, pero no siempre resulta suficientemente discriminatoria, y es necesario un segundo método de tipificación.

#### Tipificación por electroforesis de proteínas e *immunoblotting*

Las diferencias de las proteínas expresadas por los clones de *Legionella* pueden utilizarse como marcadores moleculares cuando se analizan separándolas mediante electroforesis (SDS-PAGE). Los patrones proteicos pueden ser detectados por tinción, inmunoblots o por autorradiografía. Se trata de una metodología simple pero de difícil interpretación. No se utiliza de manera

rutinaria, aunque sí se ha utilizado para el estudio del perfil de proteínas de membrana externa (155).

#### Análisis multienzimático por electroforesis

Se basa en el análisis de las variantes electroforéticas de un conjunto de enzimas. Las diferencias en la secuencia polipeptídica provoca diferencia en la movilidad electroforética. Se trata de un método muy discriminatorio pero muy laborioso y especializado.

#### *1.12.4.2 Métodos genotípicos*

Se basan en el estudio de las diferencias en los ácidos nucleicos (plásmidos y DNA cromosómico). Estos métodos pueden contribuir con gran exactitud a establecer relaciones epidemiológicas.

#### Análisis de plásmidos

Los plásmidos son elementos extracromosómicos autónomos, que se multiplican independientemente y de los que son portadores muchas bacterias. Pueden codificar factores de virulencia o de resistencia microbiana. El desarrollo de técnicas económicas y rápidas de extracción del DNA plasmídico y separación según su medida por electroforesis en gel de agarosa ha llevado al frecuente uso de los plásmidos en la investigación epidemiológica. Hay que tener en cuenta que muchas de las cepas de origen clínico no contienen plásmidos siendo más frecuente en cepas de origen ambiental. Es una técnica con una capacidad discriminatoria no óptima para estudios epidemiológicos prolongados, sería adecuada para estudiar brotes muy limitados en el espacio y en el tiempo.

#### Análisis de DNA cromosómico con endonucleasas de restricción

El DNA cromosómico es más estable que el DNA plasmídico y su análisis permite diferenciar cepas de *Legionella*. Cuando se digiere una molécula de DNA con un enzima de restricción se obtienen un número de fragmentos equivalentes a las veces que se encuentra repetido el lugar de restricción a lo largo de la molécula. El tamaño de los distintos fragmentos de restricción traduce la separación entre dos lugares de restricción contiguos. Un cambio por

mutación o recombinación, en uno de estos lugares de restricción lo hace irreconocible para el enzima y se traduce en una variación del perfil de fragmentos de restricción que es el responsable del polimorfismo existente entre las distintas cepas. La comparación de cepas para detectar el polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) se consigue separando los fragmentos obtenidos mediante una electroforesis en un gel de agarosa que se tiñe con bromuro de etidio. Cada banda corresponde a la suma de todos los fragmentos generados del tamaño correspondiente a aquella movilidad electroforética. El poder discriminatorio es bueno, pero los perfiles generados hacen difícil la comparación de los diferentes clones.

#### Electroforesis en campo pulsante

Para una especie bacteriana concreta, podemos encontrar enzimas de restricción de baja frecuencia de corte, es decir, enzimas cuyo lugar de restricción, por su longitud y secuencia, se encuentran raramente a lo largo del DNA cromosómico de la especie bacteriana en cuestión. El uso de este tipo de enzimas permite la macrorrestricción del DNA de la bacteria y la división del DNA en pocos fragmentos de gran tamaño, que no pueden separarse por técnicas de electroforesis convencional, por lo que se requieren técnicas en las que la orientación del campo eléctrico es variable periódicamente, son las denominadas técnicas de electroforesis en campo pulsante o *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE).

La combinación de estas dos técnicas, macrorrestricción del DNA y separación de los fragmentos por PFGE, se ha aplicado con mucha frecuencia en estudios epidemiológicos en brotes de *Legionella*. Se obtienen así, patrones de restricción sencillos que representan el DNA cromosómico bacteriano distribuido en unas pocas bandas con movilidades electroforéticas distintas (figura 9). Sin embargo, las características de estas técnicas determinan una serie de cambios a tener en cuenta en las distintas fases en las que se divide el proceso de macrorrestricción y PFGE: el procedimiento de extracción de DNA, obliga a inmovilizar las células bacterianas en bloques de agarosa, en los que se llevará a cabo la lisis y la digestión con enzimas de restricción, y la técnica de

electroforesis utilizada para la separación de fragmentos debe ser una PFGE, con las características diferenciales propias de ésta.

Esta técnica tiene un elevado poder discriminativo y reproducibilidad. Pero se trata de un proceso largo y necesita un equipamiento especial, lo cual hace que pocos laboratorios lo puedan realizar.

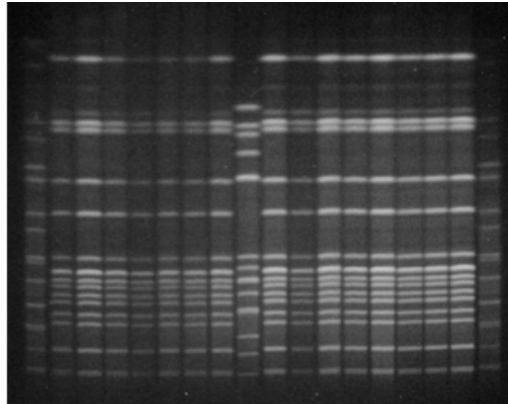


Figura 9. Patrones de PFGE de cepas de *L. pneumophila*.

#### Tipificación basada en técnicas de PCR

Mediante PCR y un proceso rápido de extracción de DNA, a partir de una única colonia se puede subtipificar en pocas horas. Se han desarrollado diferentes protocolos de tipificación:

- Rep-PCR, RAPD y AP-PCR (156). Se basa en la unión aleatoria de cebadores de PCR no dirigidos contra un locus específico que se hibridan con suficiente afinidad y permitirán el inicio de la polimerización. Da como resultado mezclas complejas de producto de PCR que pueden ser traducidos en perfiles de DNA con la ayuda de geles de electroforesis. La reproducibilidad de estas técnicas es muy baja, los perfiles genómicos son complejos y se necesitan programas informáticos.

- AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) (157). Esta técnica se basa en una reacción de restricción-ligación seguida de una amplificación por PCR. En un primer paso, el DNA genómico se digiere con una enzima de restricción y los fragmentos se ligan a unos adaptadores contruidos especialmente. Los

fragmentos generados por este método son dianas para ser amplificados mediante cebadores específicos para los adaptadores utilizados en la ligación. Los productos de PCR se pueden visualizar fácilmente mediante electroforesis en gel de agarosa. Se trata de una técnica muy reproducible. Si se acopla este sistema a un sistema de detección automática de fluorescencia por láser mejora la detección de los fragmentos (158).

Actualmente, la necesidad de disponer de métodos de caracterización molecular que ofrezcan resultados rápidos y reproducibles, con la posibilidad de ser compartidos en tiempo real por diferentes laboratorios, ha llevado al desarrollo de métodos de secuenciación de genes basados en técnicas de MLST (*multilocus sequence typing*). Una variante de esta técnica es el SBT (*sequence-based typing*) en la que se emplean tanto genes *housekeeping* como genes de virulencia, y ha sido empleada para la tipificación molecular de *L. pneumophila* serogrupo 1.

Los resultados obtenidos con el estudio de seis genes, *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS* y *proA*, que son los que se han empleado en el primer estudio piloto de SBT en el EWGLI, son muy prometedores, existiendo actualmente una base de datos a la que se puede acceder para la asignación de alelos ([www.ewgli.org](http://www.ewgli.org)). Aunque los brotes de legionelosis pueden aparecer en distintos ámbitos (hospitalario, comunitario o relacionado con viajeros) la estrategia para la tipificación epidemiológica de los cultivos de *Legionella* puede ser la misma.





# JUSTIFICACIÓN

---



## JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS

*Legionella* se caracterizó por primera vez en 1976, desde entonces ya se han descrito más de 50 especies diferentes y numerosos serogrupos. *Legionella* es un bacilo gramnegativo móvil. Es una bacteria ampliamente distribuida en la naturaleza, siendo su nicho natural el medio acuático. Su amplia distribución en el medio hace inviable, actualmente, llevar a cabo actuaciones preventivas dirigidas a su reservorio natural. Existen diversos factores que hacen de *Legionella* un microorganismo de especial interés. En primer lugar, por sus características microbiológicas, por la interacción con los protozoos de vida libre en su hábitat acuático y, por último por su capacidad patógena mediante mecanismo invasor y, probablemente, también por un mecanismo inmunitario.

*Legionella* es responsable del 3-15% de las neumonías adquiridas en la comunidad y es, asimismo, causa frecuente de neumonía intrahospitalaria. En la comunidad la mayoría de casos se presentan de forma esporádica, aunque en ocasiones, también en forma de brote epidémico. Las fuentes más frecuentes de infección son las torres de refrigeración, así como los sistemas de agua corriente, especialmente los sistemas de distribución de agua caliente.

El diagnóstico de la legionelosis puede realizarse por aislamiento del agente causal a partir de muestras respiratorias, por detección de antígenos, detección de DNA o también mediante la detección de anticuerpos específicos por serología. El aislamiento del microorganismo por cultivo a partir de muestras respiratorias, si las muestras seleccionadas son adecuadas, tiene una sensibilidad del 70% y una especificidad del 100%, pudiendo detectar todas las especies del género y serogrupos. La detección directa en muestras respiratorias de *L. pneumophila* serogrupo 1 por inmunofluorescencia directa tiene una sensibilidad que oscila entre el 25 y el 70% y una especificidad del 95%. Las técnicas de detección de antígeno en orina son muy útiles para el diagnóstico rápido de la neumonía por *Legionella*, dado que la orina constituye un excelente reservorio de antígeno. La primera prueba disponible fue una técnica de radioinmunoensayo, que exigía disponer de instalaciones radiactivas. La sustitución de aquella por técnicas de enzoinmunoensayo y de inmunocromatografía ha permitido su incorporación como técnica diagnóstica

en la mayoría laboratorios. Dado que el antígeno de *Legionella* es termoestable, se recomienda aplicar un tratamiento térmico a la muestra para evitar falsos positivos. Además, la concentración del antígeno presente en la orina, incrementa la sensibilidad de las técnicas descritas sin afectar la especificidad. La sensibilidad de estas técnicas varía entre un 60 y un 90%, en función de la técnica y si se concentra o no la orina, mientras que su especificidad es muy elevada (>99%).

Por otro lado, durante un brote epidémico de *Legionella*, es importante realizar investigación ambiental para identificar la fuente de infección responsable. La detección de instalaciones de riesgo permitirá establecer hipótesis sobre el posible del brote. Esto, junto a los análisis microbiológicos obtenidos de muestras clínicas y de estas instalaciones, posibilitará la identificación del foco causal.

A pesar de que las nuevas técnicas de detección de antígeno han supuesto una mejora considerable en el diagnóstico etiológico de las neumonías por *Legionella*, en muchos casos es necesario concentrar la muestra por ultrafiltración selectiva para obtener una sensibilidad suficiente. En determinadas situaciones, los procesos de concentración por ultrafiltración pasiva de la orina pueden suponer un retraso en la obtención de los resultados. Por otro lado, tampoco se dispone de ninguna técnica que nos permita poder establecer un pronóstico de la evolución del paciente en el momento del diagnóstico.

En muchos casos, en que *Legionella* es aislada a partir de muestra clínica, la identificación bioquímica y basada en técnicas de inmunofluorescencia son insuficientes para la identificación correcta a nivel de especie.

Además, en situaciones de brote epidémico, en que es fundamental detectar el foco responsable, los cultivos que se emplean de forma habitual, así como las técnicas moleculares para establecer relaciones epidemiológicas, son lentas por un lado y también laboriosas, retrasando la identificación del foco.

De esta forma, la Tesis se ha centrado en la estandarización y evaluación clínica de nuevas técnicas inmunológicas cualitativas y cuantitativas de detección de

antígeno de *Legionella* en orina orientados al diagnóstico y también para establecer si la cuantificación del antígeno presente en orina puede constituir un índice de valor pronóstico en la evolución de la neumonía. También se han estudiado nuevos métodos de concentración de antígeno por centrifugación y la evaluación de una técnica inmunológica de detección de antígeno en muestras ambientales para su utilización en el cribaje medioambiental.

Finalmente, la Tesis se completa con la evaluación de técnicas de secuenciación para la identificación a nivel de especie del género *Legionella* y de tipaje molecular intraespecífico.



# OBJETIVOS

---





## 2. OBJETIVOS

Los objetivos planteados en esta Tesis doctoral son los siguientes:

1. Estudiar la utilidad de nuevas técnicas de enzimoimmunoensayo y de inmunocromatografía para la detección de antígeno de *L. pneumophila* serogrupo 1 en muestras de orina en el diagnóstico de la legionelosis.
2. Evaluar y optimizar una nueva técnica de concentración por ultrafiltración selectiva de antígeno de *Legionella* mediante centrifugación.
3. Determinar la concentración de antígeno de *Legionella* presente en la orina de los pacientes en el momento del diagnóstico y durante el tratamiento. Estudiar su valor pronóstico.
4. Estudiar la aplicabilidad de las técnicas inmunológicas de detección de antígeno para determinar la presencia de *Legionella* en muestras ambientales.
5. Evaluar y optimizar la utilidad de una una técnica basada en la secuenciación del gen *mip* para la identificación de las diferentes especies del género *Legionella*.
6. Optimizar y evaluar de la utilidad de una nueva técnica basada en la secuenciación de genes específicos para el estudio molecular de la clonalidad de distintas cepas de *L. pneumophila*.



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---



### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio de la utilidad de nuevas técnicas de enzimoimmunoensayo y de inmunocromatografía para la detección de antígeno de *L. pneumophila* serogrupo 1 en muestras de orina en el diagnóstico de la legionelosis (Artículo 1 y 2).

La neumonía continúa representando un problema sanitario de gran magnitud que puede ser causado por un amplio número de microorganismos. Entre las etiologías de las neumonías mas graves, están las producidas por *Legionella*. En el transcurso de un episodio neumónico por *L. pneumophila* se libera antígeno específico que puede detectarse en la orina. El antígeno se puede detectar desde el primer día desde la aparición de los síntomas y persistir durante días e incluso semanas (94). Las técnicas de detección de antígeno permiten un diagnóstico muy rápido de la neumonía por *L. pneumophila*, por lo que estas técnicas han revolucionado el diagnóstico de esta enfermedad y resultan muy útiles para la detección de un mayor número de casos y la aplicación de un tratamiento antibiótico específico en las fases iniciales de la enfermedad (95). También permiten el reconocimiento temprano de brotes epidémicos, favoreciendo una rápida respuesta en la aplicación de medidas preventivas. La disponibilidad de técnicas de detección de antígeno de *L. pneumophila* incrementa el diagnóstico de la legionelosis y disminuye la mortalidad, posiblemente debido al diagnóstico rápido en las primeras fases de la enfermedad.

En este apartado de la Tesis se exponen los resultados obtenidos en la evaluación de dos técnicas de detección de antígeno de *L. pneumophila* serogrupo 1 en muestras de orina: un enzimoimmunoensayo EIA (Bartels ELISA *Legionella* urinary antigen, Bartels Inc.) y una inmunocromatografía ICT (Uni-Gold *Legionella* Urinary Antigen test, Trinity Biotech, Wicklow, Ireland).

#### \* **Detección de antígeno de *Legionella* en muestras de orina mediante una nueva técnica de enzimoimmunoanálisis (Artículo 1).**

Para la evaluación del EIA de Bartels se estudiaron muestras de orina de 4 grupos de pacientes: Grupo 1: 42 pacientes con legionelosis diagnosticada por

cultivo y/o serología; grupo 2: 47 pacientes con legionelosis diagnosticada por EIA Binax en orina concentrada (OC); grupo 3: 49 pacientes con neumonía de otras etiologías y grupo 4: 73 pacientes sin neumonía. Para aumentar la sensibilidad de la técnica se concentró el antígeno presente en la orina mediante ultrafiltración selectiva pasiva antes de realizar la detección de antígeno de *Legionella*. En las muestras de orina sin concentrar (ONC), mediante el EIA de Bartels se detectó antígeno en el 80.9% de las muestras del grupo 1, y en el 68.1% de muestras del grupo 2. Mediante el EIA de Binax se detectó en el 64.3% y en el 40.4%, respectivamente.

Tabla 3. Sensibilidad en muestras de ONC de los pacientes diagnosticados de legionelosis.

Test	Grupo 1			Grupo 2
	Total	Cultivo	Serología	
<b>EIA</b>	80.9	100	70.4	68.1
<b>Bartels</b>	(34/42)	(12/12)	(19/27)	(32/47)
<b>EIA Binax</b>	64.3	83.3	55.5	40.4
	(27/42)	(10/12)	(15/27)	(19/47)

Utilizando OC para el diagnóstico de la legionelosis, con el EIA de Bartels se detectó antígeno en el 72.2% de muestras del grupo 1 y en el 100% de muestras del grupo 2. Obteniéndose con el EIA de Binax un resultado positivo en el 72.2% y el 100%, respectivamente. La especificidad para las dos técnicas tanto en ONC como en OC fue del 100%. Para evaluar el aumento de la sensibilidad por la concentración del antígeno, los resultados en ONC y OC en las dos técnicas, solo se valoraron las muestras que se pudieron testar no concentradas y concentradas del mismo paciente (Tabla 4).

En las muestras de los pacientes diagnosticados de legionelosis (Grupo 1 y 2) también se estudiaron los ratios obtenidos por cada uno de los EIA. Para el EIA de Bartels las medianas obtenidas en ONC (mediana: 11.250; 5-95 percentiles: 0.805-61.330) y en OC (mediana 42.00; 5-95 percentiles: 1.100-62.900) fueron significativamente superiores ( $p < 0.0001$ ) que los ratios obtenidos por el EIA de Binax, en ONC (mediana: 2.575; 5-95 percentiles: 0.634-24.055) y en OC (mediana: 11.770; 5-95 percentiles: 1.210-36.450).

Tabla 4. Sensibilidad de las 2 técnicas en muestra de orina no concentrada y concentrada.

Test		Grupo 1			Grupo 2
		Total	Cultivo	Seroconversión	
<b>EIA Bartels</b>	<b>ONC</b>	66.7 (12/18)	100 (2/2)	65.5 (10/16)	68.3 (28/41)
	<b>OC</b>	72.2 (13/18)	100 (2/2)	68.7 (11/16)	100 (41/41)
<b>EIA Binax</b>	<b>ONC</b>	55.5 (10/18)	100 (2/2)	50 (8/16)	39 (16/41)
	<b>OC</b>	72.2 (13/18)	100 (2/2)	68.7 (11/16)	100 (41/41)

La concentración de la orina por ultrafiltración selectiva aumenta el número de diagnósticos de legionelosis, tanto por Bartels como por Binax. Además, los ratios de las muestras de los pacientes con legionelosis obtenidos por Bartels y Binax fueron significativamente superiores ( $p < 0.0001$ ) en orina concentrada que en ONC. Hubo diferencias significativas entre el EIA de Bartels y el EIA de Binax respecto a la mayor capacidad del primero para detectar antígeno de *L. pneumophila* en muestras de orina no concentrada.

**\* Detección de antígeno de *Legionella* a partir de extractos de cultivo mediante enzoinmunoanálisis.**

Se estudio el limite de sensibilidad de las técnicas de EIA (Bartels y Binax) y la capacidad de detectar antígenos de otras especies diferentes de *L. pneumophila* mediante extractos de cultivos purificados. Se realizó la técnica de EIA directamente de sobrenadantes sometidos a tratamiento térmico a 100°C. Ambos EIAs detectaron antígeno de los 14 serogrupos de las cepas de *L. pneumophila* ATCC, en cambio para *L. bozemanii* ATCC sólo se obtuvo un resultado positivo por EIA de Binax y en el caso de *L. longbeachae* ATCC ambos tests fueron negativos.

El limite de detección de ambas técnicas para detectar antígeno soluble de *L. pneumophila* serogrupo 1 se determinó utilizando diluciones seriadas a partir de las suspensiones tratadas térmicamente. Para ello, nos basamos en el contaje de colonias del cultivo realizado previo a la ebullición de la suspensión. Para el EIA de Bartels el límite de detección fue de  $1.3 \times 10^4$  ufc/mL y  $1.3 \times 10^5$  ufc/mL

para el EIA de Binax. Los resultados para todos los serogrupos se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Límite de detección del EIA de Bartels y el EIA de Binax para detectar antígeno soluble de *Legionella*.

Especie y/o serogrupo		Límite de detección (ufc/ml)	
		EIA Binax	EIA Bartels
<i>Legionella pneumophila</i>	1	$1.3 \times 10^5$	$1.3 \times 10^4$
	2	$1.3 \times 10^8$	$1.3 \times 10^7$
	3	$4 \times 10^8$	$4 \times 10^7$
	4	$3 \times 10^8$	$3 \times 10^7$
	5	$3.5 \times 10^8$	$3.5 \times 10^7$
	6	$3.8 \times 10^8$	$3.8 \times 10^7$
	7	$5 \times 10^8$	$5 \times 10^6$
	8	$9 \times 10^7$	$9 \times 10^6$
	9	$8 \times 10^7$	$8 \times 10^6$
	10	$7.8 \times 10^8$	$7.8 \times 10^7$
	11	$1.7 \times 10^8$	$1.7 \times 10^7$
	12	$2 \times 10^8$	$2 \times 10^7$
	13	$7.2 \times 10^8$	$7.2 \times 10^7$
	14	$7 \times 10^7$	$7 \times 10^6$
<i>Legionella bozemanii</i>		$2.9 \times 10^8$	-
<i>Legionella longbeachae</i>		-	-

**\* Detección de antígeno de *Legionella* en muestras de orina mediante técnica de inmunocromatografía (Artículo 2).**

Se estudió la sensibilidad y especificidad de una nueva técnica de ICT (Uni-Gold LUA) en el diagnóstico de la legionelosis, comparando los resultados con la ICT de Binax en muestras de orina de tres grupos de pacientes. Grupo 1: 80 pacientes diagnosticados de neumonía por *L. pneumophila*; grupo 2: 60 pacientes con neumonía de otras etiologías y grupo 3: 50 pacientes sin neumonía y con infección urinaria. Se realizó un tratamiento térmico previo de la muestra y la concentración de la orina mediante ultrafiltración selectiva para aumentar la sensibilidad y la especificidad.



Uni-Gold LUA detectó antígeno en el 63.75% de muestras de ONC y en el 95% de muestras de OC de pacientes del grupo 1, y la ICT de Binax detectó antígeno en el 67.5% de muestras de ONC y en el 97.5% de OC. Las muestras de ONC de pacientes con infecciones del tracto respiratorio superior de diferente origen etiológico, bacteriemia sin foco respiratorio o pacientes con infecciones del tracto urinario (grupos 2 y 3) fueron todas negativas para ambos tests (100% especificidad). En OC la especificidad fue del 96% (72/75) para Uni-Gold LUA y del 100% para Binax Now (tabla 6). La concordancia de ambas técnicas analizando los tres grupos de muestras estudiados en ONC fue del 98.42% ( $k=0.961$ , DE: 0.023), para la OC la concordancia fue del 97.2% ( $k=0.935$ , DE: 0.028). No se encontraron diferencias significativas en el número de resultados positivos entre ambas técnicas, ni al utilizar muestras de ONC ( $p=0.250$ ) ni de OC ( $p=0.655$ ).

Tabla 6. Comparación de los resultados obtenidos por Uni-Gold LUA y ICT de Binax en la detección de antígeno de *Legionella*.

		Binax Now			
		ONC n(%)		OC n(%)	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Uni-Gold LUA	Positivo	51 (96.2)	0 (0)	76 (97.4)	3 (3.9)
	Negativo	3 (3.8)	136 (100)	2 (206)	74 (96.1)
Total		54 (100)	136 (100)	78 (100)	77 (100)

Recientemente, se ha podido evaluar una segunda versión de esta nueva ICT (Uni-Gold LUA plus) en 22 orinas de pacientes con legionelosis y en 98 orinas de pacientes con neumonía por neumococo (63) o con infección urinaria (35). Tanto Uni-Gold LUA plus como Binax Now han obtenido una sensibilidad en ONC del 95,4 % (21/22) y del 100% en OC (22/22). La especificidad de ambas técnicas fue del 100% tanto en ONC como en OC.

**\* Detección de antígeno de *Legionella* a partir de extractos de cultivo mediante inmunocromatografía.**

Se estudió el límite de sensibilidad y la especificidad de Uni-Gold LUA para detectar antígeno soluble de *L. pneumophila* y de diferentes especies de

*Legionella*, respectivamente. La detección de antígeno mediante ICT se realizó directamente en sobrenadantes de extractos de cultivo sometidos a tratamiento térmico a 100°C. En las condiciones del estudio, la técnica de ICT únicamente fue positiva para el serogrupo 1 y 7, siendo negativa para el resto de serogrupos y para *L. bozemanii* ATCC y *L. longbeachae* ATCC.

El límite de detección de ambas técnicas Uni-Gold LUA y ICT Binax para detectar antígeno soluble de *L. pneumophila* serogrupo 1 se determinó utilizando diluciones seriadas a partir de las suspensiones de los cultivos tratadas térmicamente. Nos basamos en el conteo de colonias del cultivo realizado previo a la ebullición de la suspensión. Para Uni-Gold LUA el límite de detección fue de  $1.2 \times 10^5$  ufc/mL y  $1.2 \times 10^4$  ufc/mL para el ICT Binax.

Tal y como hemos comentado previamente, desde su descubrimiento a finales de los años 70 hasta la actualidad, las técnicas de detección de antígeno de *L. pneumophila* han demostrado su gran utilidad en el diagnóstico de la legionelosis. Las primeras de ellas fueron técnicas caseras de EIA y RIA, que aunque útiles no estaban al alcance de todos los laboratorios (159, 160). La adaptación comercial del EIA produjo una amplia difusión de la utilización de estas técnicas y ya en las primeras evaluaciones se demostraron que eran unas técnicas sensibles, específicas y rápidas con resultados en 3-4 horas (99, 161, 162).

Entre las técnicas de EIA más utilizadas se encuentran el EIA Binax y el EIA de Biotest, ambos presentan una similar sensibilidad y especificidad en ONC y OC. Si las comparamos con el EIA de Bartels, esta también presenta una buena sensibilidad y especificidad. Mostrando el EIA de Bartels una mayor sensibilidad para la detección de antígeno en ONC.

La introducción de una técnica de ICT (Binax Now) permite la detección de *L. pneumophila* serogrupo 1 en muestras de orina en 15 minutos o menos, con unos resultados muy similares a los obtenidos con técnicas de EIA (98, 163). La ICT reduce el tiempo de diagnóstico, es menos compleja y requiere menos equipamiento que las técnicas de EIA lo que permite su uso en todo tipo de laboratorios.

Recientemente, se han desarrollado nuevas ICT. Diederer y Peters han evaluado algunos de estos nuevos ensayos (164-166), comparando los resultados con los obtenidos con Binax Now en muestras de ONC. Para la técnica SAS *Legionella* test (SA Scientific, USA) los resultados de sensibilidad y especificidad fueron 82.9% y 99%, respectivamente. En el caso de el test SD Bioline *Legionella* Antigen Test (Standard Diagnostics, Inc., Korea) la sensibilidad fue del 31.5% y la especificidad del 98.8%. Para el Rapid U *Legionella* Antigen test (Diamondial, Sees, France) la sensibilidad varía desde el 71.2% al 91.5% y la especificidad del 90 y 95.6%. Los resultados de sensibilidad obtenidos con la técnica SD Bioline son inaceptables para el uso de esta en el diagnóstico de la legionelosis. Nuestros resultados para Uni-Gold LUA fueron del 63.75% en ONC y 95% en OC, valores adecuados para este tipo de técnicas de diagnóstico etiológico.

La sensibilidad de los tests de detección de antígeno de *Legionella* aumenta al concentrar la muestra de orina (98, 102, 162, 167). Aunque la concentración de la orina no es un proceso recomendado por los fabricantes de los kits comercializados, en nuestra experiencia la concentración de la orina es un procedimiento sencillo y rápido (los resultados están disponibles en una mañana de trabajo), pero aun así muchos laboratorios consideran que alarga mucho el tiempo de procesamiento de la muestra y no la realizan. En nuestros estudios la concentración de la muestra aumenta significativamente la sensibilidad de las técnicas tanto del EIA Bartels (67.5% a un 86%) como de la ICT Uni-Gold LUA (63.7% a un 95%), aumento también observado en los otros test como el EIA Binax y ICT Binax tanto en los resultados presentados en este trabajo como en otros trabajos anteriores.

Durante los últimos años también se ha estudiado si estas técnicas tanto de EIA como ICT son capaces de detectar antígeno de *Legionella* diferente de *L. pneumophila* serogrupo 1 en muestras de orina (99, 101, 161). En el caso del EIA de Binax y EIA Biotest se demostró que si que eran capaces de detectar antígeno aunque con una sensibilidad menor que para *L. pneumophila* serogrupo 1. Helbig et al (163) evaluaron la ICT de Binax, el EIA de Binax y el EIA de Biotest con muestras artificiales preparadas con *L. pneumophila*

serogrupo 1 (Philadelphia 1, OLDA y Bellingham), serogrupo 3 y serogrupo 6 ultrasonicadas, y vieron que las tres técnicas eran capaces de detectar antígeno en todos los casos, siendo el límite de detección inferior en el caso de *L. pneumophila* serogrupo 1 cepa Philadelphia. Las tres técnicas necesitaban una concentración de los serogrupos 3 y 6, mayor de  $5 \times 10^6$  ufc/ml. En nuestro estudio el EIA de Bartels fue capaz de detectar todos los serogrupos de *L. pneumophila* del 1 al 14, especialmente *L. pneumophila* serogrupo 1. Además, el EIA de Bartels tiene un límite de detección inferior al EIA de Binax, hecho que concuerda con los mejores resultados de sensibilidad obtenidos en las muestras de orina. Probablemente, las diferencias en el método de extracción pueden justificar la diferencia en el límite de detección obtenido en nuestro estudio respecto al estudio de Helbig et al (163).

Aunque estas técnicas son capaces de detectar antígeno de todos los serogrupos y de otras especies, tienen una mayor sensibilidad para detectar *L. pneumophila* serogrupo 1, hecho que se correlaciona con la disminución de la utilidad de los tests de detección de antígeno cuando disminuye la prevalencia del serogrupo 1 como causante de la legionelosis (168). Hay que tener en cuenta que la detección de antígeno en muestras artificiales sólo nos proporciona información acerca de la capacidad de detectar antígeno de los diferentes tests dado que en una muestra real ciertos antígenos pueden ser excluidos de la orina al no ser filtrados por los capilares glomerulares del riñón. Con lo que realmente se desconoce la concentración real que alcanzan estos antígenos en la orina y la capacidad de las técnicas para detectarlos.

En resumen, el EIA de Bartels es una técnica sensible y específica para el diagnóstico de la legionelosis. En nuestra experiencia, este EIA es útil para el diagnóstico rápido de la neumonía por *Legionella*, ofreciendo una mejor alternativa al EIA Binax cuando se realiza en ONC. En el caso de la ICT Uni-Gold LUA es una alternativa en el diagnóstico de la legionelosis, reduciendo el tiempo si lo comparamos con las técnicas de EIA y con unos resultados comparables al Binax Now. En la segunda versión preliminar recientemente evaluada hemos comprobado que esta técnica tiene unos valores de sensibilidad y especificidad equiparables a los de la ICT de Binax, tanto en ONC como en OC.

Evaluación y optimización de una nueva técnica de concentración por ultrafiltración selectiva de antígeno de *Legionella* mediante centrifugación (Artículo 3).

La detección de antígeno de *L. pneumophila* en orina por EIA y por ICT se han mostrado como unas técnicas rápidas, sensibles y específicas para el diagnóstico de la legionelosis (98, 163, 169, 170). La concentración del antígeno presente en las muestras de orina aumenta considerablemente la sensibilidad de estas técnicas sin detrimento de su especificidad. Sin embargo, la concentración de la muestra puede provocar un cierto retraso en la obtención de los resultados.

La concentración del antígeno presente en la orina se realiza mayoritariamente mediante ultrafiltración selectiva pasiva. Este sistema consiste en una celda donde la muestra de orina está en contacto con un material absorbente a través de una membrana de permeabilidad selectiva, que permite el paso del agua y solutos de bajo peso molecular, concentrándose progresivamente el antígeno al disminuir el volumen de líquido (figura 10). Este proceso puede durar de 1 a 6 horas, dependiendo de las características de la muestra.

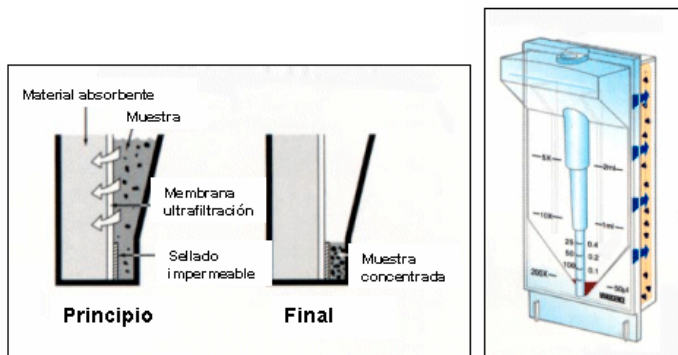


Figura 10. Sistema de ultrafiltración pasiva.

En este apartado de la Tesis evaluamos un nuevo método de concentración por ultrafiltración selectiva mediante centrifugación (Amicom Ultra-4, Millipore). Este dispositivo combina una membrana de ultrafiltración de baja adsorción en una carcasa vertical acoplada a un tubo de centrifugación (figura 11). El agua y

solutos de bajo peso molecular atraviesan la membrana como consecuencia de la centrifugación, concentrándose progresivamente el antígeno de *Legionella*.

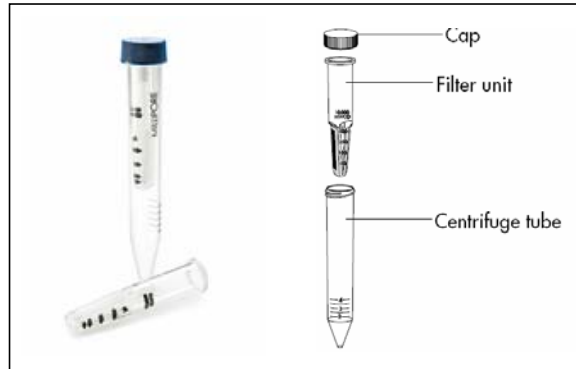


Figura 11. Sistema de ultrafiltración por centrifugación.

Evaluamos el nuevo método de concentración en muestras de pacientes con infección por *L. pneumophila*, diagnosticados con EIA Binax; en pacientes con neumonía de otras etiologías y pacientes sin signos ni síntomas de neumonía y diagnosticados de infección urinaria. Una alícuota de cada muestra ya había sido estudiada previamente por EIA de Binax tras ser concentrada con el método de ultrafiltración pasiva.

Todas las muestras de orina de los 3 grupos de pacientes fueron concentradas mediante ultrafiltración selectiva por centrifugación y el antígeno de *Legionella* fue detectado por ICT Binax.

Los resultados obtenidos utilizando orina concentrada por el método de ultrafiltración por centrifugación fueron idénticos a los obtenidos previamente mediante ultrafiltración selectiva pasiva para las muestras de los pacientes diagnosticados por *Legionella*. Para asegurar que la concentración de antígeno presente en la muestra no variaba al concentrar, escogimos muestras de orina con ratios obtenidos por EIA que oscilaban desde 4.49 a 41.9 (media, 16.53; DE, 9.45). La concentración por centrifugación no representa una disminución de la sensibilidad, incluso en muestras con baja carga antigénica. Todas las muestras concentradas del grupo 2 y 3 de pacientes sin legionelosis fueron negativas por ICT.

La concordancia global entre las dos técnicas de concentración fue del 100%. El tiempo necesario para concentrar la muestra por ultrafiltración pasiva es de 1 a 3 horas, dependiendo de las características físicas de la muestra pudiendo llegar incluso a tardar más de 6 horas. En cambio, mediante la concentración por centrifugación se disminuye el tiempo a unos 15-20 minutos. Sin embargo, algunas muestras pueden requerir una centrifugación adicional para alcanzar la concentración deseada.

La concentración por ultrafiltración selectiva por centrifugación es un método rápido y fiable para la concentración de antígeno de *Legionella* en muestras de orina sin disminución de la sensibilidad ni de la especificidad. Este sistema permite reducir drásticamente el tiempo en el diagnóstico de legionelosis mediante detección de antígeno.

Determinar la concentración de antígeno de *Legionella* presente en la orina de los pacientes en el momento del diagnóstico y durante el tratamiento. Estudio de su valor pronóstico (Artículo 4).

La tasa de mortalidad de la neumonía por *Legionella* se encuentra alrededor del 10-15% en individuos sanos, pero es mayor en casos nosocomiales o por retraso en el diagnóstico. Se ha comprobado en numerosos estudios la utilidad de las técnicas de detección de antígeno en el diagnóstico rápido de la neumonía por *L. pneumophila* serogrupo 1. Pero en ninguno de ellos, se ha cuantificado la concentración de antígeno presente en las muestras de orina, así como tampoco su posible correlación con la gravedad del paciente o su estudio como posible factor pronóstico.

En este apartado del trabajo, se ha utilizado el EIA de Binax para calcular la concentración de antígeno de *Legionella* en orina en el momento del diagnóstico y durante el tratamiento. Este estudio se dividió en dos partes: la estandarización del EIA para la cuantificación de antígeno presente en las muestras mediante un antígeno de *Legionella* purificado y posteriormente, la determinación de la concentración de antígeno en las muestras.

Se estudiaron muestras de orina de 48 pacientes (40 hombres y 8 mujeres) con diagnóstico de neumonía por *Legionella*. Los pacientes fueron diagnosticados por detección de antígeno soluble de *L. pneumophila* serogrupo 1 en orina no concentrada mediante Binax Now. La edad media de los pacientes fue de 55,5 años (27-83 años). Todos los pacientes recibieron desde el inicio del ingreso tratamiento con macrólidos.

El médico responsable determinó la respuesta clínica una vez finalizado el tratamiento y en el seguimiento. La evaluación clínica se basó en la valoración global de la presentación clínica en comparación con la valoración inicial. Se consideró resolución de la neumonía cuando hubo desaparición de los signos y síntomas de neumonía: disnea, tos, expectoración, fiebre, resolución de la leucocitosis y desaparición de los infiltrados pulmonares en la radiografía de tórax, y como mejoría cuando hubo desaparición de la fiebre pero no hubo resolución completa de alguno de los signos y/o síntomas de neumonía ni de la



radiología. Las características basales de estos pacientes y de la neumonía se detallan en la tabla 7.

En cada paciente, se recogieron dos muestras seriadas, una recogida en el momento del ingreso y otra recogida 3-6 días después. Se analizaron 48 ONC recogidas en el momento del ingreso y 37 muestras de ONC recogidas 3-6 días después. En algunos casos, fue posible recoger muestras seriadas entre 11 y 20 días (9 pacientes), a los 30 (4 pacientes) y a los 60 (2 pacientes) días después del ingreso.

Para determinar la concentración de antígeno de *L. pneumophila* en las muestras de orina, se utilizó un antígeno purificado de *L. pneumophila* serogrupo 1 de concentración conocida (Binax Inc.). La concentración de antígeno en muestras de orina se cuantificó por extrapolación de la densidad óptica de las muestras con una curva estándar realizada en cada ensayo.

Tabla 7. Características clínicas de los pacientes con neumonía por *Legionella*.

Variables	N ° de pacientes (%)	
<b>&gt; 65</b>	Sí	15 (30,6)
	No	34 (69,4)
<b>Sexo</b>	Hombre	40 (83,3)
	Mujer	8 (16,6)
<b>Diabetes</b>	Sí	6 (12,2)
	No	43 (87,8)
<b>Alcohol</b>	Sí	10 (20,4)
	No	38 (77,6)
	Ex	1 (2)
<b>Fumador</b>	Sí	28 (57,1)
	No	12 (24,5)
	Ex	9 (18,4)
<b>EPOC</b>	Sí	3 (6,1)
	No	46 (93,9)
<b>Inmunosupresión</b>	Sí	4 (8,2)
	No	45 (91,8)
<b>Neumonía multilobar</b>	Sí	11 (22,4)
	No	38 (77,6)
<b>Fine</b>	I	8 (16,3)
	II	16 (32,7)
	III	14 (28,6)
	IV	7 (14,3)
	V	4 (8,2)
<b>Evolución</b>	Resolución	39 (79,6)
	Mejoría	6 (12,2)
	Muerte	4 (8,2)

Los resultados muestran que la concentración media de antígeno de todos los pacientes incluidos fue de 18,98 ng/ml (DE: 12,9) en la ONC de las muestras recogidas en el momento del ingreso. De las muestras recogidas entre 3 y 6 días después del ingreso, la media fue de 3,76 ng/ml (DE: 7,4). La concentración media de antígeno en ONC de las muestras recogidas en los días 11-20, 30 y 60 después de la admisión hospitalaria fue de 5,47 ng/ml (DE: 7,6), 3,52 ng/ml (DE: 4,6) y 1,08 ng/ml (DE: 1,5), respectivamente.

En el momento del ingreso, no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los parámetros estudiados, ni en función de las características clínicas del paciente (Tabla 8). Con respecto a la correlación con la gravedad, a pesar de que las medianas muestran una tendencia a ser mayores en los grupos de mayor gravedad (Fine V) tampoco se han encontrado diferencias significativas con la escala pronóstica de Fine (*Pneumonia severity Index*). La figura 12 muestra la mediana de la concentración de antígeno en el momento del ingreso según clasificación Fine de los pacientes.

Tabla 8. Correlación entre la concentración de antígeno en ONC y características clínicas y de la neumonía del paciente.

Variables		Ingreso		3-6 días después ingreso	
		Media (DE)	p	Media (DE)	p
> 65	Sí	15,1 (12,6)	NS	3,1 (7,9)	NS
	No	20,9 (12,7)		3,1 (5,9)	
Diabetes	Sí	17,8 (11,7)	NS	7,4 (10,7)	NS
	No	19,3 (13,1)		2,4 (5,4)	
Alcohol	Sí	21,2 (13,4)	Sí vs no: NS	3,1 (5,9)	Sí vs no: NS
	No	19 (12,7)		3,1 (6,7)	
Fumador	Sí	21,7 (12,8)	NS	4,7 (7,6)	NS
	No	16,6 (11,6)		0,5 (0,9)	
	Ex	14,6 (13,8)		-	
EPOC	Sí	22,1 (6,7)	NS	8,8 (15,2)	NS
	No	18,9 (13,1)		2,6 (5,3)	
Inmunosupresión	Sí	25,9 (7,4)	NS	-	NC
	No	18,5 (13,1)		3,1 (6,4)	
Multilobar	Sí	22,4 (14,3)	NS	5,6 (9,2)	NS
	No	18,2 (12,4)		2,5 (5,6)	
Fine	I	21,9 (15,1)	I vs V: NS I vs IV: NS I-III vs V: NS I-III vs IV: NS	3,4 (6,9)	I vs V: NS I vs IV: NS I-III vs V: NS I-III vs IV: NS
	II	19,1 (14,4)		1,9 (4,8)	
	III	18,9 (9,9)		1 (1,9)	
	IV	15,2 (13,1)		9,3 (10,9)	
	V	21,6 (15,8)		26,8 (-)	
Evolución	R	18,3 (13,2)	R vs E: NS	2,1 (5,6)	<b>R vs E: 0,008</b>
	M	17,4 (12,2)	R vs M: NS	5,9 (6,8)	<b>R vs M: 0,043</b>
	E	30,7 (3,4)	M vs E: NS	23,3 (4,9)	M vs E: NS

R Resolución, M Mejoría, E Exitus, NC No calculable, NS No significativo

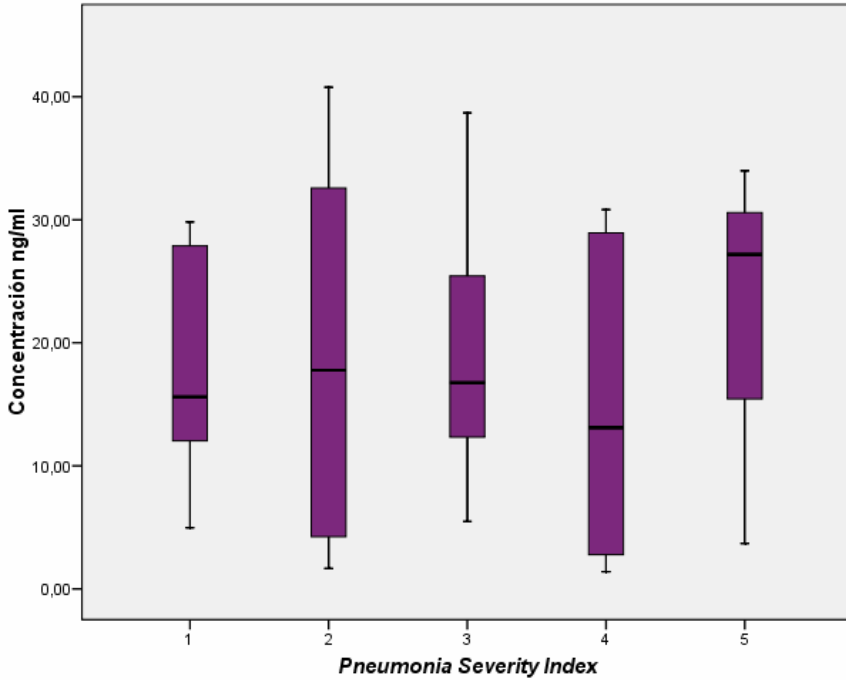


Figura 12. Mediana de la concentración de antígeno y 5-95 percentiles según *Pneumonia Severity Index*

En relación con la evolución de los pacientes, a pesar de que la concentración media de antígeno de *Legionella* en orina en el momento del ingreso fue mayor en los pacientes que fallecieron respecto a los cuáles la neumonía se les resolvió o no se resolvió totalmente, estas diferencias tampoco alcanzaron significación estadística (Tabla 8). El área bajo la curva ROC fue de 0,78 (95% IC: 0,6486-0,923). Se determinó una concentración óptima de 26,56 ng/ml con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 68,9% para discriminar los pacientes que fallecen respecto al resto.

La concentración de antígeno en ONC, disminuyó en los días posteriores al ingreso, la figura 13 representa la concentración de antígeno en muestras seriadas de ONC de todos los pacientes. El descenso en la concentración media de antígeno entre el momento del ingreso y a los 3-6 días considerando todos los pacientes fue significativo ( $p < 0.0001$ ). Si consideramos los pacientes que resolvieron completamente la neumonía la concentración de antígeno en orina a los 3-6 días ( $2,09 \pm 5,60$ ) disminuye significativamente respecto al momento del

diagnóstico ( $18.34 \pm 13,20$ ) ( $p < 0.0001$ ). En cambio, si consideramos los pacientes que mejoran, la concentración media de antígeno el día 3-6 desde el ingreso ( $5,92 \pm 6.84$ ) no disminuye significativamente respecto a la del ingreso ( $17,35 \pm 12.23$ ) ( $p = 0,080$ ). El número de pacientes que fallecieron por la neumonía es reducido ( $n=3$ ) y únicamente se dispuso de muestra de los 3-6 días después del ingreso de dos de estos pacientes. La concentración a los 3-6 días tampoco presenta diferencias significativas respecto a las que presentaron en el momento del ingreso ( $p = 0.180$ ). Los tres pacientes que fallecieron habían ingresado en UCI.

Por otro lado, la concentración de antígeno en ONC recogidas entre los días 3-6 después del ingreso fueron significativamente mayores en pacientes que mejoraron en comparación con aquellos en que la neumonía se resolvió ( $p = 0,043$ ). Los resultados se muestran en la tabla 8.

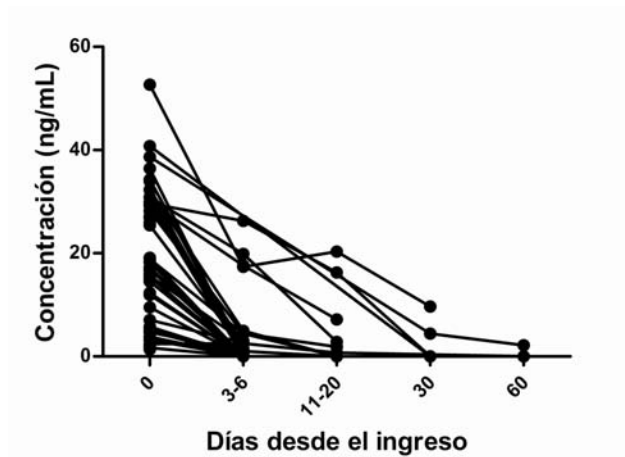


Figura 13. Cinética de la concentración de antígeno en los pacientes incluidos desde el momento del ingreso.

La figura 14 muestra la mediana y percentiles 5-95 de los 3 grupos en función de la evolución: resolución, mejoría y muerte, en las muestras de ONC en el momento de la admisión y 3-6 días después del ingreso.

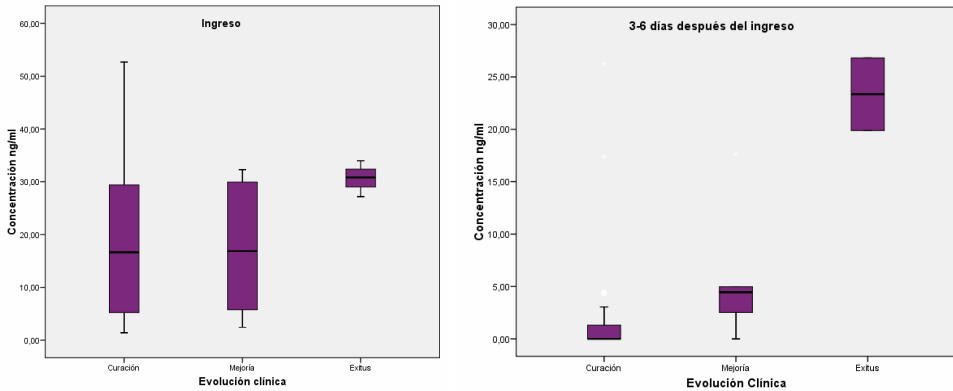


Figura 14. Mediana de la concentración de antígeno y 5-95 percentiles según la evolución

Existen muchos estudios evaluando las técnicas de detección de antígeno de *L. pneumophila* para el diagnóstico de la legionelosis. La utilidad de estas técnicas está ampliamente reconocida, pero por el momento no hay ningún estudio sobre la correlación entre la concentración de antígeno en orina y la severidad de la neumonía. En un estudio realizado por Maurin et al. (171) se describió que en pacientes con legionelosis, un elevado recuento de *Legionella* en muestras del tracto respiratorio inferior en el momento del ingreso se asocia con Fine elevado, necesidad de hospitalización en UCI y mayor tiempo de hospitalización.

La mayor dificultad asociada al manejo de las neumonías en general y también en la neumonía por *Legionella* reside en la identificación de pacientes con riesgo de muerte. Los pacientes habitualmente son estratificados en grupos de riesgo mediante la utilización de diferentes escalas pronósticas (PSI o CURB65). Estos sistemas de clasificación funcionan razonablemente bien cuando se estudian cohortes de muchos pacientes, pero no funcionan igual de bien para tomar decisiones clínicas en pacientes concretos.

Nuestro estudio confirma la asociación entre una elevada concentración de antígeno de *Legionella* en orina y un aumento de la mortalidad. La implicación de este hallazgo implica que una cuantificación de antígeno de *Legionella* en orina puede ofrecer una información muy valiosa sobre el pronóstico de la neumonía. Nuestros datos sugieren que la cuantificación de antígeno en orina

puede ser un método fácil y sensible para identificar los grupos de pacientes de mayor riesgo de muerte.

Los resultados obtenidos muestran una asociación estadísticamente significativa entre la cinética de la concentración de antígeno desde el momento del ingreso y la evolución clínica, es decir, en aquellos pacientes que han evolucionado más lentamente o que han fallecido las concentraciones de antígeno se han mantenido elevadas no evidenciándose un descenso significativo en la concentración, como sucede en los pacientes que resuelven la neumonía completamente.

Por otro lado, se han realizado algunos estudios sobre la concentración de marcadores de inflamación en suero en pacientes con legionelosis como marcadores pronósticos. En el caso de la neumonía por *Legionella* se encuentran elevados en suero los marcadores que son inducidos por el IFN- $\gamma$  (115), tales como la neopterinina (116). Otros marcadores ya clásicos de infección bacteriana, como la proteína C reactiva o la procalcitonina (PCT), se encuentran menos elevados en la neumonía por *Legionella* con respecto a otras etiologías como la neumocócica (116). Sin embargo, se ha visto que los niveles de PCT tienen valor pronóstico, siendo más elevados en pacientes con neumonía por *Legionella* con criterios de severidad y evolución desfavorable (118) (119) (172).

Una limitación importante de nuestro estudio es que el número de pacientes incluidos, y el número de pacientes con mayor gravedad, con complicaciones severas (ingreso en UCI) y que fallecen es reducido, limitando por lo tanto la potencia estadística de los resultados, y en nuestra opinión impidiendo en algunos casos alcanzar significación estadística.

En conclusión, hemos encontrado que hay mayor concentración de antígeno en los pacientes con peor evolución. La cuantificación del antígeno de *Legionella* en orina en el momento del ingreso y la posterior monitorización podrían ser útiles para identificar pacientes con un mayor riesgo de muerte y por lo tanto ser una herramienta complementaria a las escalas clínicas pronósticas actuales.

Estudiar la aplicabilidad de las técnicas inmunológicas de detección de antígeno para determinar la presencia de *Legionella* en muestras ambientales (Artículo 5).

Los brotes de legionelosis están vinculados a torres de refrigeración y otros sistemas acuáticos. El control de la colonización por *Legionella* de las torres de refrigeración y otros sistemas generadores de aerosoles puede reducir los brotes comunitarios de legionelosis (85). Además, el control del sistema de agua caliente en los hospitales es crucial para prevenir la legionelosis en pacientes con riesgo. A pesar de los avances producidos en la formulación de los medios de cultivo y las técnicas de pretratamiento, el aislamiento de legionelas en las muestras de agua es bajo, requiere mucho tiempo de procesamiento y los cultivos se prolongan durante varios días. Además, el sobrecrecimiento de otras bacterias en estas muestras y la presencia de *Legionella* viables pero no cultivables son factores que no están todavía totalmente resueltos.

Las técnicas de detección de antígeno en orina han demostrado ser en muchos estudios, técnicas rápidas, sensibles y específicas en el diagnóstico de la neumonía por *Legionella*.

En este apartado de la Tesis hemos evaluado la utilidad de un EIA (EIA de Bartels) desarrollado para la detección de antígeno de *Legionella* en muestras de orina, para detectar antígeno en muestras ambientales.

Se estudiaron muestras de 2 procedencias: muestras de agua artificiales en las que se inoculó *Legionella* hasta una concentración de  $10^4$ - $10^5$  ufc/ml (cepas ATCC: *L. pneumophila* serogrupo 1 al serogrupo 14, *L. bozemanii*, *L. longbeachae* y 9 cepas salvajes de *L. pneumophila* serogrupo 1); y, por otro lado, 68 muestras de agua reales (13 procedentes de sistemas de agua doméstica y 55 de torres de refrigeración).

Un litro de todas las aguas incluidas en el estudio fueron filtradas a través de membranas Millipore con poros de 0.2  $\mu$ m. Cada filtro fue posteriormente introducido en un tubo que contenía 1 ml de agua destilada. Todas las muestras fueron sonicadas durante 2 minutos para intentar aumentar la sensibilidad de la técnica.

En nuestro estudio, en las muestras de agua artificial el EIA de Bartels fue capaz de detectar antígeno de todos los serogrupos, aunque mostró una mayor sensibilidad para *L. pneumophila* serogrupo 1 (Tabla 9). El EIA no fue capaz de detectar antígeno de *L. bozemanii* y *L. longbeachae*. El límite de detección en agua artificial para el serogrupo 1 fue de 780 ufc/ml en el agua original antes de la filtración. La sonicación de las muestras de agua no aumentó la sensibilidad de la técnica.

Tabla 9. Resultados del EIA de Bartels en muestras de agua artificial con cepas de *Legionella*.

Cepas <i>Legionella</i>	Muestra original	Muestra filtrada		Muestra filtrada y sonicada
	Carga bacteriana (ufc/ml)	Ratio EIA	Carga bacteriana (ufc/ml)	Ratio EIA
<i>L. pneumophila</i> s.1	5 x 10 <sup>5</sup>	Overflow	3.8 x 10 <sup>7</sup>	Overflow
<i>L. pneumophila</i> s.2	1 x 10 <sup>5</sup>	12	3.7 x 10 <sup>6</sup>	12
<i>L. pneumophila</i> s.3	2 x 10 <sup>4</sup>	4.7	2.5 x 10 <sup>6</sup>	4.9
<i>L. pneumophila</i> s.4	5.3 x 10 <sup>5</sup>	8.5	4.4 x 10 <sup>7</sup>	8.9
<i>L. pneumophila</i> s.5	1 x 10 <sup>5</sup>	8.2	1.6 x 10 <sup>7</sup>	7.4
<i>L. pneumophila</i> s.6	2 x 10 <sup>5</sup>	15	1.7 x 10 <sup>7</sup>	12
<i>L. pneumophila</i> s.7	1 x 10 <sup>5</sup>	11	1 x 10 <sup>7</sup>	9
<i>L. pneumophila</i> s.8	2 x 10 <sup>5</sup>	7.5	2 x 10 <sup>7</sup>	8.5
<i>L. pneumophila</i> s.9	6 x 10 <sup>4</sup>	14.5	2.5 x 10 <sup>6</sup>	5.4
<i>L. pneumophila</i> s.10	1.5 x 10 <sup>6</sup>	4.14	2 x 10 <sup>8</sup>	4.14
<i>L. pneumophila</i> s.11	1 x 10 <sup>5</sup>	9.7	3 x 10 <sup>6</sup>	9.2
<i>L. pneumophila</i> s.12	3 x 10 <sup>5</sup>	7.1	2 x 10 <sup>7</sup>	7
<i>L. pneumophila</i> s.13	4 x 10 <sup>5</sup>	6.8	6 x 10 <sup>7</sup>	6.8
<i>L. pneumophila</i> s.14	9 x 10 <sup>5</sup>	7.2	8.2 x 10 <sup>7</sup>	7.7
<i>L. bozemanii</i>	1 x 10 <sup>5</sup>	Negativo	3 x 10 <sup>7</sup>	Negativo
<i>L. longbeachae</i>	3 x 10 <sup>5</sup>	Negativo	1 x 10 <sup>7</sup>	Negativo

Otras técnicas inmunológicas basadas en técnicas de EIA han sido previamente evaluadas en la detección de antígeno en muestras ambientales. Lück y Liebscher (173) evaluaron una técnica de detección de antígeno de *Legionella* (Binax Equate, ME, USA) especialmente diseñada para la detección cualitativa de *Legionella* en muestras de agua potable. En experimentos *in vitro* encontraron un límite de detección de 1000 ufc/ml para *L. pneumophila* serogrupo 1. Sin embargo, el test fue incapaz de detectar antígeno del resto de serogrupos. Por otro lado, Horn et al (24) evaluaron la utilidad del EIA de Biotest para detectar



*Legionella* en muestras de agua, siendo capaces de detectar antígeno de todos los serogrupos y otras especies, con un límite de detección para *L. pneumophila* serogrupo 1 de 10 ufc/ml. Por el contrario, Helbig y colaboradores (163) evaluaron el mismo EIA y obtuvieron un límite de detección de  $1 \times 10^4$  para *L. pneumophila* serogrupo 1 Philadelphia y de  $6 \times 10^5$  para *L. pneumophila* serogrupo 1 OLDA.

Como alternativa a los métodos inmunológicos, han sido desarrolladas técnicas de PCR para la detección de *Legionella* en muestras de agua. Levi y colaboradores (40) evaluaron 120 muestras de agua utilizando una PCR en tiempo real para detectar *L. pneumophila* y obtuvieron un límite de detección equivalente a 800 ufc/ml. Utilizando el EIA de Bartels hemos obtenido un límite de detección similar y que no requiere de un equipamiento tan costoso ni tan especializado.

Si analizamos los resultados de las muestras de agua de abastecimiento, el EIA de Bartels fue positivo en 8 muestras de agua procedentes de torres de refrigeración, en 7 de las cuales el cultivo fue negativo. Estos deberían ser considerados como falsos positivos. Sin embargo, debido a la contaminación de los cultivos con otras bacterias, no podemos descartar la posibilidad de que estas 7 muestras fueran realmente positivas y que el sobrecrecimiento bacteriano impidiera su aislamiento. En la única muestra con cultivo positivo la concentración de *L. pneumophila* fue de 220 ufc/ml, menor que el límite de detección estimado empleando muestras artificiales. Resultados como estos, ya fueron descritos previamente por otros autores (173). Un resultado positivo por EIA cuando la concentración de *Legionella* está por debajo del límite de detección del test puede ser debido a la presencia de *Legionella* no-viables y/o a la presencia de antígeno libre (174). Estos hallazgos pueden sugerir que se produzca una acumulación del antígeno en las torres de refrigeración. Otra posibilidad sería la reacción cruzada del EIA con otras bacterias, aunque en estudios previos el EIA de Bartels se ha mostrado muy específico (169, 170).

De las 27 muestras positivas por cultivo pero negativas por el EIA de Bartels, se aisló en 13 casos *L. pneumophila* serogrupo 1 con una concentración menor a

100 ufc/ml; en 8 casos *L. pneumophila* serogrupo 2-14 (7 muestras > 100 ufc/ml) y en 5 casos otras especies de *Legionella*. Todos los resultados negativos fueron obtenidos en muestras con concentraciones por debajo del límite de detección (Tabla 9). El límite de detección para *L. pneumophila* serogrupo 2-14 fue menor que para el serogrupo 1. Por lo tanto, su utilidad para analizar muestras de agua que no contienen serogrupo 1 es limitada.

El límite de detección obtenido por la técnica de EIA no parece suficiente para la vigilancia de los sistemas acuáticos susceptibles de colonización de *Legionella* y por lo tanto de ser fuente de infección. Sin embargo, dado que el nivel de colonización del agua que implique un riesgo de legionelosis no ha sido bien establecido, que los brotes de legionelosis suelen ir vinculados a una amplificación de los niveles de *Legionella* en los sistemas de agua y que durante un brote son necesarias una rápida identificación y descontaminación del sistema de agua colonizado, el EIA de Bartels podría ser útil como un método rápido de cribado para analizar un alto número de muestras. De todas maneras, es necesario seguir realizando los cultivos de las muestras, debido, por un lado, a la baja sensibilidad de la técnica y por otro lado a la necesidad de realizar estudios de epidemiología molecular.

Evaluar y optimizar la utilidad de una técnica basada en la secuenciación del gen *mip* para la identificación de las diferentes especies del género *Legionella* (Artículo 6).

La progresiva identificación de otras especies diferentes de *L. pneumophila* como agentes causantes de neumonía hace necesario la búsqueda de nuevos métodos para su identificación y valorar la importancia de estas infecciones. La correcta identificación de especies de *Legionella* diferentes de *L. pneumophila* mediante los métodos fenotípicos clásicos todavía hoy es difícil. Entre estos métodos están: la inmunofluorescencia (IF) con anticuerpos policlonales o monoclonales, aglutinación en porta o con partículas de látex y ensayos con anticuerpos género-específicos mediante *dot-blot* a partir de colonias.

Además de los métodos fenotípicos, se han descrito numerosos métodos genotípicos para la identificación: análisis del DNA genómico, como ribotipado y RAPD (175, 176), análisis de genes específicos (RNAr, *mip*, *rpoB*) (90, 177, 178) y análisis de regiones internas de dichos genes (ej. region intergénica de DNAr) (179).

De entre todas las técnicas existentes, la amplificación y secuenciación del gen *mip* (*macrophage infectivity potentiator*) parece ser el método más adecuado para la correcta identificación de las especies del género *Legionella*. La secuencia de *mip* tiene más posiciones discriminativas que otros genes. El procedimiento es sencillo, requiriendo una PCR y una sola reacción de secuenciación. El *European Working Group for Legionella Infections* (EWGLI) ha desarrollado una base de datos *online* fácil de utilizar y actualizada, que permite contrastar todas las secuencias para la identificación de las diferentes cepas de *Legionella* a nivel de especie.

El objetivo del estudio fue optimizar la identificación de cepas de *Legionella* mediante la secuenciación del gen *mip*. Este trabajo se enmarca en un proyecto de colaboración europeo, liderado por el EWGLI, para establecer la utilidad y la robustez de la secuenciación del gen *mip* para implementarlo como método de referencia en diferentes laboratorios europeos mediante una aplicación *online* de análisis.

A partir de cepas de *Legionella* crecidas en BCYE a 37°C, se realizó la extracción de DNA mediante lisis térmica y se realizó la reacción de PCR con *primers* específicos para la región a amplificar obteniéndose productos de 661 a 715 pb.

Para la reacción de secuenciación de cada una de las cadenas del producto de PCR, se utilizó el kit ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems). La secuenciación se llevó a cabo en el secuenciador automático ABI 3100- Avant (Applied Biosystems).

Mediante el análisis de las secuencias se alinearon las dos cadenas (*sense* y *antisense*) y se analizaron con el programa *SeqScape* comparándolas con una secuencia de referencia. La secuencia consenso obtenida fue introducida en la aplicación *online* del EWGLI ([http://www.hpa-bioinfotools.org.uk/mip\\_ID.html](http://www.hpa-bioinfotools.org.uk/mip_ID.html)).

En total, se estudiaron 10 cepas de *Legionella* spp., de las cuales se pudo analizar la secuencia del gen *mip* de 8 de ellas (en dos casos no se consiguió realizar la reacción de secuenciación). Al comparar nuestras secuencias con las secuencias de la base de datos mediante la aplicación *online*, en las 8 se obtuvo una similitud superior al 98%, los resultados para cada una de las cepas se pueden ver en la tabla 10.

Tabla 10. Resultados obtenidos para las cepas de *Legionella*.

Nº cepa	Resultado	Concordancia
1	<i>L. bozemanii</i>	100%
2	<i>L. longbeachae</i>	100%
3	<i>L. jordanis</i>	ns
4	<i>L. dumoffii</i>	100%
5	<i>L. bozemanii</i>	100%
6	<i>L. pneumophila</i>	98.7%
7	<i>L. oakridgensis</i>	100%
8	<i>L. jamestowniensis</i>	ns
9	<i>L. pneumophila</i>	99.1%
10	<i>L. sainthelensis</i>	100%

ns: no secuenciada

La identificación convencional de *Legionella* a partir del cultivo en BCYE- $\alpha$  se basa en: a) Tinción de Gram: Las especies del género *Legionella* son bacilos gramnegativos, de coloración muy pálida y con algunas formas largas filamentosas. b) Resiembra en agar sangre y en agar de *Legionella* selectivo. Las colonias de *Legionella* crecen en agar *Legionella* selectivo, pero no crecen en agar sangre. c) Prueba de la oxidasa, catalasa y hipurato. *Legionella* es positiva en el test de la oxidasa y de la catalasa y *L. pneumophila* hipurato positiva. d) Inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales específicos para confirmar que se trata de *L. pneumophila* y la aglutinación con partículas de látex para diferenciar entre *L. pneumophila* serogrupo 1 y serogrupo 2-14.

Estas herramientas, únicamente nos permiten identificar *L. pneumophila* y dentro de esta entre serogrupo 1 y el resto de serogrupos por aglutinación con partículas de látex. La secuenciación del gen *mip*, permite la identificación de las diferentes especies de *Legionella* a partir de cultivo, de una manera sencilla para un laboratorio con capacidad y equipamiento para realizar técnicas de biología molecular, y con accesibilidad para secuenciar. Además la extracción de DNA para la amplificación se realiza con una simple lisis térmica.

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio fueron comparados con los obtenidos en los 19 centros (11 países) colaboradores del EWGLI. Se obtuvieron resultados válidos en 12 de los 19 centros. Todos los centros excepto uno identificó correctamente todas las cepas analizadas, y este centro sólo falló en una de las cepas. Además, solo dos centros obtuvieron porcentajes de similitud por debajo del 98% para alguna de las cepas analizadas.

Las plataformas de secuenciación utilizadas por los diferentes laboratorios fueron: Plataformas ABI, CEQ8000 Genetic Analysis System o MegaBACE DNA Sequencing Platform. La utilización de una u otra plataforma de secuenciación no influyó en la calidad de las secuencias obtenidas.

Durante los últimos años, ha aumentado el uso de la secuenciación en diferentes ámbitos de la Microbiología, por este motivo es importante la

monitorización de estas técnicas mediante un programa externo de evaluación de la calidad, como el EQA (External Quality Assessment) llevado a cabo por el EWGLI. Los resultados obtenidos por los diferentes laboratorios muestran que la identificación de *Legionella* spp. mediante la secuenciación del gen *mip* es una técnica sólida, y que la mayoría de los laboratorios son capaces de reproducir y de dar un resultado correcto. El estudio, sin embargo, también ha demostrado que en laboratorios no habituados a la realización de este tipo de técnicas es necesario realizar una formación adecuada por personal especializado para poder obtener resultados fiables.

Ratcliff y colaboradores (90) demostraron que no había evidencias de recombinación genética en las secuencias entre especies. Sin embargo, se ha descrito que algunas especies como *L. geestiana* no producen el amplicón deseado y no es posible secuenciarla con esta técnica. Por eso en algunos casos será recomendable confirmar los resultados con la secuenciación de otros genes (*dnaj*, *23S-5S ribosomal intergenic spacer region*) (179, 180) o incluso se ha publicado recientemente la utilización de secuenciación del gen *mip* y detección mediante *arrays* con 30 sondas oligonucleótidas (181). Para la amplificación de *L. geestiana*, se han descrito unos *primers* adicionales que permiten amplificar el gen *mip* de *L. geestiana* (5'-GTNACNGTNGANTANACNGG junto con Legmip\_r) (182), o también mediante el análisis de otros genes como *rpoB* o *rnpB* (178, 183).

Actualmente, la homología de la secuencia de una cepa de *Legionella* de especie desconocida con las especies de *Legionella* incluidas en la base de datos obtendría unos porcentajes de similitud entre el 98-100%. Si observamos los resultados obtenidos para las cepas salvajes analizadas vemos que aunque estas secuencias están incluidas en la base de datos, la mayoría de los laboratorios obtiene resultados >98% y no del 100%. Esto podría ser debido a que el archivo de texto de las secuencias contiene errores o ambigüedades, debido sobretodo a que no se analizan o se analizan parcialmente. Para ayudar en este aspecto se ha implementado una herramienta de análisis de la calidad de la secuencia (*algoritmo phred*). La secuencia se puede cargar *online* y la herramienta nos proporciona automáticamente la calidad de la secuencia. Esta

herramienta hace que los resultados sean menos subjetivos, aunque es necesaria una secuencia de cómo mínimo 300 nucleótidos.

La identificación genotípica de *Legionella* spp. es una herramienta necesaria en los laboratorios de referencia. Disponer de protocolos estandarizados, librerías para la identificación y herramientas *online* supone una gran ayuda. Actualmente, el grupo está trabajando para la mejoría de la técnica tanto en la metodología como en el análisis de las secuencias y también se está estudiando la posibilidad de añadir más genes (16S RNAr, *rpoB*, *rnpB*, *groEL*) en el sistema de identificación.

Optimización y evaluación de la utilidad de una técnica basada en la secuenciación de genes específicos para el estudio molecular de la clonalidad de distintas cepas de *L. pneumophila* (Artículo 7).

Las cepas de *L. pneumophila* aisladas de muestras clínicas y ambientales en el transcurso de un brote, han de ser analizadas molecularmente para identificar la fuente de infección y establecer la asociación epidemiológica. En los últimos años, tal y como hemos comentado en la Introducción de la Tesis, han aparecido numerosas técnicas de caracterización molecular de cepas de *Legionella* con capacidades discriminatorias diferentes.

El método que más se ha utilizado para la discriminación de subtipos de *L. pneumophila* está basado en el uso de anticuerpos monoclonales. EL CDC utiliza para la discriminación de subtipos de *L. pneumophila* un panel de anticuerpos monoclonales que fueron sugeridos como un estándar internacional. Este método resulta rápido para subdividir cepas del serogrupo 1, sin embargo no resulta suficientemente discriminatorio, por lo que es necesario utilizar un segundo método de subtipificación. Además estos reactivos no son fácilmente accesibles para los laboratorios y no existen sueros para la subtipificación de serogrupos de *L. pneumophila* diferentes al 1. Para evitar estos inconvenientes se han desarrollado métodos alternativos basados en caracteres genotípicos, cuya principal ventaja se basa en la relativa estabilidad de genotipo bacteriano frente al fenotipo, entre las cuales se encontraría la electroforesis en campo pulsado (PFGE) y la AFLP (*Amplification Fragment Length Polymorphism*).

Actualmente, la necesidad de disponer de métodos de caracterización molecular que ofrezcan resultados rápidos y reproducibles, con la posibilidad de ser compartidos por diferentes laboratorios, ha llevado al desarrollo de métodos de secuenciación de genes basados en técnicas de MLST (*Multilocus sequence typing*). Una variante de esta técnica es el SBT (*Sequence base typing*) en la que se emplean tanto genes *housekeeping* como genes de virulencia, y que ha sido empleada para la tipificación molecular de *L. pneumophila* serogrupo 1.

El objetivo de este trabajo fue determinar la utilidad de una técnica de secuenciación de 6 genes para la tipificación de cepas de *L. pneumophila*. Este



proyecto también se enmarca en un proyecto de colaboración europeo organizado por EWGLI.

Se estudiaron 20 aislados clínicos y ambientales de *L. pneumophila* serogrupo 1 (previamente estudiados por AFLP). A todos los aislados se les realizó la secuenciación de 6 genes *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS* y *proA*. Se utilizaron los *primers* que se muestran en la tabla 11, los mismos para la amplificación y para la secuenciación, excepto para el gen *mompS*, en el cuál se utilizó un *primer* de secuenciación diferente.

Tabla 11. Primers utilizados en el MLST.

Gen	Primer	Posiciones	Primer (5'-3')	Tm
<b><i>flaA</i></b>	flaA-587F	568-587	GCG TAT TGC TCA AAA TAC TG	55 °C
	flaA-960R	981-960	CCA TTA ATC GTT AAG TTG TAG G	
<b><i>pilE</i></b>	pilE-35F	12-35	CAC AAT CGG ATG GAA CAC AAA CTA	55 °C
	pilE-453R	471-453	GCT GGC GCA CTC GGT ATC T	
<b><i>asd</i></b>	asd-511F	487-511	CCC TAA TTG CTC TAC CAT TCA GAT G	55 °C
	asd-1039R	1062-1039	CGA ATG TTA TCT GCG ACT ATC CAC	
<b><i>mip</i></b>	Mip-74F	58-74	GCT GCA ACC GAT GCC AC	55 °C
	mip-595R	616-595	CAT ATG CAA GAC CTG AGG GAA C	
<b><i>mompS</i></b>	mompS-450F	430-450	TTG ACC ATG AGT GGG ATT GG	55 °C
	Momp-1126R	1140-1126	TGG ATA AAT TAT CCA GCC GGA CTT C	
	<i>mompS</i> -1015R	1032-1015	CAG AAG CTG CGA AAT CAG	
<b><i>proA</i></b>	proA-1107F	1090-1107	GAT CGC CAA TGC AAT TAG	55 °C
	proA-1553R	1570-1553	ACC ATA ACA TCA AAA GCC	

Tm: Temperatura de *melting*

Como paso previo a la reacción de secuenciación, se realizó la comprobación del producto de PCR (Tabla 12). Para la reacción de secuenciación de cada una de las cadenas del producto de PCR, se utilizó el kit ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) y la secuenciación, se llevó a cabo en el secuenciador automático ABI 3100- Avant (Applied Biosystems).

Tabla 12. Regiones utilizadas para el MLST de *L. pneumophila*.

Gen	Producto PCR (pb)	Region usada para asignar alelo		GenBank
		nt	posiciones	
<i>flaA</i>	394	182	653-749	X83232
<i>pilE</i>	459	333	103-435	AF048690
<i>Asd</i>	575	473	538-1010	AF034213
<i>Mip</i>	558	402	117-518	AJ496265
<i>mompS</i>	710	352	523-1010	AF078136
<i>proA</i>	480	405	1134-1230	M31884

Los archivos de las secuencias *forward* y *reverse* de los 6 genes diana se sometieron a la herramienta *online Sequence Quality Tool* desde la página web del EWGLI ([www.ewgli.org](http://www.ewgli.org)). Esta herramienta alinea las dos cadenas, encuentra el principio y el final en la secuencia de las posiciones de referencia, recorta la secuencia utilizando estas posiciones y finalmente las compara con las secuencias de la base de datos SBT. La aplicación identifica un perfil alélico y una secuencia tipo (ST). Secuencias con <100% de similitud se identifican con -1, indicando también las posiciones donde hay diferencias. Las secuencias con baja calidad se deben repetir o analizar más exhaustivamente con un Software de análisis de DNA, como por ejemplo el *SeqScape* (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas se introducen en un formulario *online* que nos dará el número de alelo que corresponde a cada secuencia (figura 15).

Sequence Entry Form

Allele	Sequence	Allele Number	
<i>flaA</i>	TCAAACCAACCATCAATTT CAGTATCGGCAGCACAAAAG CTTCTCTCTTGGTGGTATT	3	Reset flaA sequence
<i>pilE</i>	ATGCTCAGTCATGTACATTT TATGAAAGAAATAGCCGTATGA AACAAATCCGGCTTTACCCCTG	4	Reset pilE sequence
<i>asd</i>	CGCTGTTGGTATTAGTCGTA TTAAATGTGGCGACTTACCAG TCTGTTTCCGGGACTGGCAA	1	Reset asd sequence
<i>mip</i>	TGCCGATTTGGGGAAGAATT TTAAAATCAAGGCATAGAT GTTAATCCGGGAAGCAATGGC	1	Reset mip sequence
<i>mompS</i>	ACGACAGTGATCACTGGTTT GATTTTGGTAACTGGCACAAA CTACAAACACAA&GTGGGATG	14	Reset mompS sequence
<i>proA</i>	TATGAAAACCCCTACTGGGA CGGCAACACAAATGACCTTTG GTGATGGTGACACCATGATG	9	Reset proA sequence
Please enter your Strain Designation here			
Reset form		display results	

Figura 15. Formulario de entrada de secuencias

El perfil alélico obtenido para cada una de las cepas (tabla 13) permite comparar fácilmente las cepas de *Legionella* aislada de los pacientes y las cepas aisladas en las posibles fuentes de infección ambientales. Además, nos permite comparar los resultados con otros laboratorios de una manera objetiva.

Tabla 13. Perfiles alélicos obtenidos con las cepas estudiadas

Id cepa	Serogrupo	Origen	Perfil alélico
12	1	Ambiental	6,10,15,28,9,14
13	6	Clínico	3,13,1,28,14,9
14	8	Clínico	3,10,1,28,14,10 <sup>§</sup>
15	8	Ambiental	3,10,1,28,14*,9
16	10	Clínico	2,10,3,28,9,4
17	1	Ambiental	4 <sup>§</sup> ,4,3,1,1,1
18	1	Clínico	5,2,22,27,6,9 <sup>§</sup>
19	1	Clínico	5,2,22,27,6,10
20	1	Clínico	4,8,11,10,10,12
21	1	Clínico	4,7,11,3,11,12
22	1	Clínico	5,1,22,30,6,10
23	1	Clínico	3,4,1,1,14,9
24	1	Clínico	3,4,1,1,14,9.
25	1	Clínico	5,1,22,10,6,10
26	1	Clínico	5,10,22,15,6,2
27	1	Clínico	4,1,3,9,1,14,11
28	1	Clínico	4,1,1,3,9,14,1
29	1	Clínico	10,22,15,5,2,6,6
30	1	Clínico	NA,22,15,5,2,6
31	1	Clínico	NA,3,18,1,15,10

NA No alineado; <sup>§</sup> Tipo incorrecto; \* Tipo correcto pero con *mismatches*

El análisis de los resultados mostró que obtuvimos un porcentaje de acierto en el perfil alélico del 90% (81 alelos de 90). Los alelos mal identificados están señalados en la tabla 13. Los resultados de concordancia obtenidos se consideraron aceptables. También hay que valorar que el análisis de las 20 cepas se realizó en tres fases con 1 año de diferencia. En una primera fase se analizaron 10 cepas y obtuvimos un porcentaje de concordancia del 93% (56/60), en la segunda fase se analizaron 5 cepas y con una concordancia del 100% y en la última fase otras 5 cepas más con una concordancia del 100%.

El porcentaje total de resultados con el 100% de concordancia, teniendo en cuenta todos los centros que enviaron resultados válidos fue: para la primera distribución del 56% (9 de 16 centros) y del 76% (19 de 25 centros) para la segunda distribución. La mayoría de los participantes utilizaron plataformas ABI para la secuenciación. Sin embargo, no hubo diferencias aparentes en la calidad de las secuencias obtenidas con otras plataformas.

Con los resultados obtenidos en el estudio, hemos podido observar que para realizar estas técnicas de secuenciación es necesario que el laboratorio sea capaz de obtener unas secuencias de alta calidad para poder obtener unos resultados comparables. Por este motivo, el EWGLI ha visto necesario establecer un *EQA* para controlar la calidad en el tipaje de *L. pneumophila* por secuenciación.

En la primera distribución, no se utilizó la herramienta *online* para analizar la calidad de las secuencias (*SQT*, *Sequence Quality Tool*), directamente se comparaba la secuencia con las de la base de datos. Posteriormente, se pudieron analizar los archivos de las secuencias que no concordaban con lo esperado y se vio que en muchas de ellas había errores. Sin embargo, los resultados preliminares obtenidos en esta primera fase ya demostraron que la SBT era una excelente técnica en laboratorios con experiencia en esta tecnología, pero que en laboratorios con poca experiencia solía haber problemas con la calidad del DNA secuenciado y con el posterior análisis.

En la segunda distribución, se mejoraron los resultados al realizarse mediante una herramienta *online SQT*, el análisis de la calidad de la secuencia obtenida. Si la calidad era óptima podíamos comparar nuestra secuencia con las de la base de datos. En caso contrario, lo recomendado era repetir la secuencia.

La secuenciación basada en los 6 genes descritos ha permitido distinguir con un alto nivel de discriminación las cepas epidemiológicamente relacionadas de las no relacionadas. Es una técnica rápida y reproducible para tipaje de *L. pneumophila*, que además permite compartir resultados con otros laboratorios.

# CONCLUSIONES

---



#### 4. CONCLUSIONES

Estudio de la utilidad de nuevas técnicas de enzimoimmunoensayo y de inmunocromatografía para la detección de antígeno de *L. pneumophila* serogrupo 1 en muestras de orina en el diagnóstico de la legionelosis

(Artículos 1 y 2)

- \* EIA de Bartels es una técnica sensible y específica para el diagnóstico de la legionelosis.
- \* En nuestra experiencia, este EIA es útil para el diagnóstico rápido de la neumonía por *Legionella*, ofreciendo una alternativa al EIA Binax cuando se realiza en ONC.
- \* La nueva técnica inmunocromatográfica (Uni-Gold LUA), es una alternativa en el diagnóstico de la legionelosis, reduciendo el tiempo en la obtención de los resultados si lo comparamos con las técnicas de EIA y con unos resultados comparables a la ICT de Binax, especialmente la segunda versión Uni-Gold LUA plus.

Evaluación y optimización de una nueva técnica de concentración por ultrafiltración selectiva de antígeno de *Legionella* mediante centrifugación

(Artículo 3).

- \* La concentración por ultrafiltración selectiva por centrifugación es un método rápido y fiable para la concentración de antígeno de *Legionella* en muestras de orina sin disminución de la sensibilidad ni la especificidad.
- \* Este sistema permite reducir el tiempo en el diagnóstico de legionelosis mediante detección de antígeno.

Determinar la concentración de antígeno de *Legionella* presente en la orina de los pacientes en el momento del diagnóstico y durante el tratamiento. Estudio de su valor pronóstico (Artículo 4).

- \* La cuantificación del antígeno de *Legionella* en orina en el momento del ingreso es útil para identificar pacientes con un mayor riesgo de muerte.
- \* Los resultados obtenidos muestran una asociación entre la cinética de la concentración de antígeno desde el momento del ingreso y la evolución clínica, es decir, en aquellos pacientes que han evolucionado más lentamente o que han fallecido las concentraciones de antígeno se han mantenido elevadas.

Estudiar la aplicabilidad de las técnicas inmunológicas de detección de antígeno para determinar la presencia de *Legionella* en muestras ambientales (Artículo 5)

- \* La técnica EIA de Bartels para la detección de antígeno de *Legionella* en muestras de orina presenta un límite de detección insuficiente para su aplicación en muestras ambientales. Además únicamente detecta antígeno de *L. pneumophila*.
- \* Sin embargo, dado que en situación de brote epidémico de legionelosis estos suelen ir vinculados a un aumento de los niveles de *Legionella* en los sistemas de agua, estas técnicas de detección de antígeno pueden ser de utilidad como método de cribado rápido, permitiendo analizar un elevado número de muestras simultáneamente.



Evaluar y optimizar la utilidad de una técnica basada en la secuenciación del gen *mip* para la identificación de las diferentes especies del género *Legionella* (Artículo 6).

- \* La identificación de *Legionella* spp. mediante la secuenciación del gen *mip* es una técnica sólida, y que la mayoría de los laboratorios son capaces de reproducir y de dar un resultado correcto.
- \* La identificación genotípica de *Legionella* spp. es una herramienta necesaria en los laboratorios de referencia.
- \* Disponer de protocolos estandarizados, librerías para la identificación y herramientas *online* suponen una gran ayuda para la identificación de las diferentes especies de *Legionella*.

Optimización y evaluación de la utilidad de una técnica basada en la secuenciación de genes específicos para el estudio molecular de la clonalidad de distintas cepas de *L. pneumophila* (Artículo 7).

- \* La secuenciación basada en los 6 genes descritos (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*) ha permitido distinguir con un alto nivel de discriminación las cepas epidemiológicamente relacionadas de las no relacionadas.
- \* Es una técnica rápida y reproducible para tipaje de *L. pneumophila*, que además permite comparar de forma objetiva resultados entre diferentes laboratorios.



# **BIBLIOGRAFÍA**

---



## BIBLIOGRAFÍA

1. **Fraser, D. W., T. R. Tsai, W. Orenstein, W. E. Parkin, H. J. Beecham, R. G. Sharrar, J. Harris, G. F. Mallison, S. M. Martin, J. E. McDade, C. C. Shepard, and P. S. Brachman.** 1977. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med* **297**:1189-97.
2. **McDade, J. E., C. C. Shepard, D. W. Fraser, T. R. Tsai, M. A. Redus, and W. R. Dowdle.** 1977. Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med* **297**:1197-203.
3. **Feeley, J. C., R. J. Gibson, G. W. Gorman, N. C. Langford, J. K. Rasheed, D. C. Mackel, and W. B. Baine.** 1979. Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* **10**:437-41.
4. **Terranova, W., M. L. Cohen, and D. W. Fraser.** 1978. 1974 outbreak of Legionnaires' Disease diagnosed in 1977. Clinical and epidemiological features. *Lancet* **2**:122-4.
5. **Osterholm, M. T., T. D. Chin, and D. O. Osborne.** 1957. A 1957 outbreak of legionnaires disease associated with a meat packing plant. *Am J Epidemiol*:60-67.
6. **Benson, R. F., and B. S. Fields.** 1998. Classification of the genus *Legionella*. *Semin Respir Infect* **13**:90-9.
7. **Fang, G. D., V. L. Yu, and R. M. Vickers.** 1989. Disease due to the Legionellaceae (other than *Legionella pneumophila*). Historical, microbiological, clinical, and epidemiological review. *Medicine (Baltimore)* **68**:116-32.
8. **Diederer, B. M.** 2008. *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *J Infect* **56**:1-12.
9. **CDC.** 2000. Legionnaires' Disease associated with potting soil--California, Oregon, and Washington, May-June 2000. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **49**:777-8.
10. **Kubota, M., K. Tomii, R. Tachikawa, Y. Harada, R. Seo, R. Kaji, Y. Takeshima, M. Hayashi, T. Nishimura, and K. Ishihara.** 2007. [*Legionella longbeachae* pneumonia infection from home garden soil]. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* **45**:698-703.
11. **Wallis, L., and P. Robinson.** 2005. Soil as a source of *Legionella pneumophila* serogroup 1 (Lp1). *Aust N Z J Public Health* **29**:518-20.
12. **Zusman, T., G. Yerushalmi, and G. Segal.** 2003. Functional similarities between the *icm/dot* pathogenesis systems of *Coxiella burnetii* and *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **71**:3714-23.
13. **Birtles, R. J., T. J. Rowbotham, D. Raoult, and T. G. Harrison.** 1996. Phylogenetic diversity of intra-amoebal legionellae as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison. *Microbiology* **142 ( Pt 12)**:3525-30.
14. **Adeleke, A., J. Pruckler, R. Benson, T. Rowbotham, M. Halablab, and B. Fields.** 1996. *Legionella*-like amebal pathogens--phylogenetic status and possible role in respiratory disease. *Emerg Infect Dis* **2**:225-30.

15. **Rodgers, F. G., P. W. Greaves, A. D. Macrae, and M. J. Lewis.** 1980. Electron microscopic evidence of flagella and pili on *Legionella pneumophila*. *J Clin Pathol* **33**:1184-8.
16. **Hebert, G. A., C. S. Callaway, and E. P. Ewing, Jr.** 1984. Comparison of *Legionella pneumophila*, *L. micdadei*, *L. bozemanii*, and *L. dumoffii* by transmission electron microscopy. *J Clin Microbiol* **19**:116-21.
17. **Rogers, B. H., G. R. Donowitz, G. K. Walker, S. A. Harding, and M. A. Sande.** 1979. Opportunistic pneumonia: a clinicopathological study of five cases caused by an unidentified acid-fast bacterium. *N Engl J Med* **301**:959-61.
18. **Jantzen, E., A. Sonesson, T. Tangen, and J. Eng.** 1993. Hydroxy-fatty acid profiles of *Legionella* species: diagnostic usefulness assessed by principal component analysis. *J Clin Microbiol* **31**:1413-9.
19. **Wong, K. H., C. W. Moss, D. H. Hochstein, R. J. Arko, and W. O. Schalla.** 1979. "Endotoxicity" of the Legionnaires' disease bacterium. *Ann Intern Med* **90**:624-7.
20. **Conlan, J. W., and L. A. Ashworth.** 1986. The relationship between the serogroup antigen and lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila*. *J Hyg (Lond)* **96**:39-48.
21. **Szeto, L., and H. A. Shuman.** 1990. The *Legionella pneumophila* major secretory protein, a protease, is not required for intracellular growth or cell killing. *Infect Immun* **58**:2585-92.
22. **Hoffman, P.** 1984. Bacterial Physiology, p. 61-67. *In* C. Thornsberry, A. Balows, and J. C. Feeley (ed.), *Legionella: Proceedings of the 2nd International Symposium American Society for Microbiology*, Washington, DC.
23. **Pine, L., P. S. Hoffman, G. B. Malcolm, R. F. Benson, and M. J. Franzus.** 1986. Role of keto acids and reduced-oxygen-scavenging enzymes in the growth of *Legionella* species. *J Clin Microbiol* **23**:33-42.
24. **Thornsberry, C., A. Balows, and J. C. Feeley.** 1984. *Legionella: Proceedings of the 2nd International Symposium American Society for Microbiology*, Washington, DC.
25. **Stout, J. E., V. L. Yu, and M. G. Best.** 1985. Ecology of *Legionella pneumophila* within water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* **49**:221-8.
26. **Rowbotham, T. J.** 1986. Current views on the relationships between amoebae, legionellae and man. *Isr J Med Sci* **22**:678-89.
27. **Stout, J. E., R. R. Muder, S. Mietzner, M. M. Wagener, M. B. Perri, K. DeRoos, D. Goodrich, W. Arnold, T. Williamson, O. Ruark, C. Treadway, E. C. Eckstein, D. Marshall, M. E. Rafferty, K. Sarro, J. Page, R. Jenkins, G. Oda, K. J. Shimoda, M. J. Zervos, M. Bittner, S. L. Camhi, A. P. Panwalker, C. J. Donskey, M. H. Nguyen, M. Holodniy, and V. L. Yu.** 2007. Role of environmental surveillance in determining the risk of hospital-acquired legionellosis: a national surveillance study with clinical correlations. *Infect Control Hosp Epidemiol* **28**:818-24.

28. **Lasheras, A., H. Boulestreau, A. M. Rogues, C. Ohayon-Courtes, J. C. Labadie, and J. P. Gachie.** 2006. Influence of amoebae and physical and chemical characteristics of water on presence and proliferation of *Legionella* species in hospital water systems. *Am J Infect Control* **34**:520-5.
29. **Lee, T. C., J. E. Stout, and V. L. Yu.** 1988. Factors predisposing to *Legionella pneumophila* colonization in residential water systems. *Arch Environ Health* **43**:59-62.
30. **Rogers, J., A. B. Dowsett, P. J. Dennis, J. V. Lee, and C. W. Keevil.** 1994. Influence of Plumbing Materials on Biofilm Formation and Growth of *Legionella pneumophila* in Potable Water Systems. *Appl Environ Microbiol* **60**:1842-1851.
31. **Kaufmann, A. F., J. E. McDade, C. M. Patton, J. V. Bennett, P. Skaliy, J. C. Feeley, D. C. Anderson, M. E. Potter, V. F. Newhouse, M. B. Gregg, and P. S. Brachman.** 1981. Pontiac fever: isolation of the etiologic agent (*Legionella pneumophila*) and demonstration of its mode of transmission. *Am J Epidemiol* **114**:337-47.
32. **Luck, P. C., H. M. Wenchel, and J. H. Helbig.** 1998. Nosocomial pneumonia caused by three genetically different strains of *Legionella pneumophila* and detection of these strains in the hospital water supply. *J Clin Microbiol* **36**:1160-3.
33. **Bollin, G. E., J. F. Plouffe, M. F. Para, and B. Hackman.** 1985. Aerosols containing *Legionella pneumophila* generated by shower heads and hot-water faucets. *Appl Environ Microbiol* **50**:1128-31.
34. **Woo, A. H., A. Goetz, and V. L. Yu.** 1992. Transmission of *Legionella* by respiratory equipment and aerosol generating devices. *Chest* **102**:1586-90.
35. **Kool, J. L., A. E. Fiore, C. M. Kioski, E. W. Brown, R. F. Benson, J. M. Pruckler, C. Glasby, J. C. Butler, G. D. Cage, J. C. Carpenter, R. M. Mandel, B. England, and R. F. Breiman.** 1998. More than 10 years of unrecognized nosocomial transmission of legionnaires' disease among transplant patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* **19**:898-904.
36. **Blatt, S. P., M. D. Parkinson, E. Pace, P. Hoffman, D. Dolan, P. Lauderdale, R. A. Zajac, and G. P. Melcher.** 1993. Nosocomial Legionnaires' disease: aspiration as a primary mode of disease acquisition. *Am J Med* **95**:16-22.
37. **Yu, V. L.** 1993. Could aspiration be the major mode of transmission for *Legionella*? *Am J Med* **95**:13-5.
38. **Johnson, J. T., V. L. Yu, M. G. Best, R. M. Vickers, A. Goetz, R. Wagner, H. Wicker, and A. Woo.** 1985. Nosocomial legionellosis in surgical patients with head-and-neck cancer: implications for epidemiological reservoir and mode of transmission. *Lancet* **2**:298-300.
39. **Venezia, R. A., M. D. Agresta, E. M. Hanley, K. Urquhart, and D. Schoonmaker.** 1994. Nosocomial legionellosis associated with aspiration of nasogastric feedings diluted in tap water. *Infect Control Hosp Epidemiol* **15**:529-33.

40. **Levy, P. Y., N. Teysseire, J. Etienne, and D. Raoult.** 2003. A nosocomial outbreak of *Legionella pneumophila* caused by contaminated transesophageal echocardiography probes. *Infect Control Hosp Epidemiol* **24**:619-22.
41. **Lowry, P. W., R. J. Blankenship, W. Gridley, N. J. Troup, and L. S. Tompkins.** 1991. A cluster of legionella sternal-wound infections due to postoperative topical exposure to contaminated tap water. *N Engl J Med* **324**:109-13.
42. **Brabender, W., D. R. Hinthorn, M. Asher, N. J. Lindsey, and C. Liu.** 1983. *Legionella pneumophila* wound infection. *Jama* **250**:3091-2.
43. **Anand, C. M., A. R. Skinner, A. Malic, and J. B. Kurtz.** 1983. Interaction of *L. pneumophila* and a free living amoeba (*Acanthamoeba palestinensis*). *J Hyg (Lond)* **91**:167-78.
44. **Kwaik, Y. A.** 2000. Invasion of mammalian and protozoan cells by *Legionella pneumophila*. *Subcell Biochem* **33**:383-410.
45. **Harb, O. S., L. Y. Gao, and Y. Abu Kwaik.** 2000. From protozoa to mammalian cells: a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens. *Environ Microbiol* **2**:251-65.
46. **Stone, B. J., and Y. Abu Kwaik.** 1998. Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infect Immun* **66**:1768-75.
47. **Bozue, J. A., and W. Johnson.** 1996. Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Infect Immun* **64**:668-73.
48. **Nahapetian, K., O. Challemel, D. Beurtin, S. Dubrou, P. Gounon, and F. Squinazi.** 1991. The intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in protozoa from hospital plumbing systems. *Res Microbiol* **142**:677-85.
49. **Kirby, J. E., J. P. Vogel, H. L. Andrews, and R. R. Isberg.** 1998. Evidence for pore-forming ability by *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* **27**:323-36.
50. **Carratala, J., F. Gudiol, R. Pallares, J. Dorca, R. Verdager, J. Ariza, and F. Manresa.** 1994. Risk factors for nosocomial *Legionella pneumophila* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* **149**:625-9.
51. **Horwitz, M. A.** 1983. The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J Exp Med* **158**:2108-26.
52. **Horwitz, M. A.** 1983. Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *J Exp Med* **158**:1319-31.
53. **Vogel, J. P., H. L. Andrews, S. K. Wong, and R. R. Isberg.** 1998. Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. *Science* **279**:873-6.
54. **Gao, L. Y., O. S. Harb, and Y. Abu Kwaik.** 1997. Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa. *Infect Immun* **65**:4738-46.



55. **Gao, L. Y., O. S. Harb, and Y. A. Kwaik.** 1998. Identification of macrophage-specific infectivity loci (*mil*) of *Legionella pneumophila* that are not required for infectivity of protozoa. *Infect Immun* **66**:883-92.
56. **Cianciotto, N. P., and B. S. Fields.** 1992. *Legionella pneumophila mip* gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:5188-91.
57. **Jacob, T., J. C. Escallier, M. V. Sanguedolce, C. Chicheportiche, P. Bongrand, C. Capo, and J. L. Mege.** 1994. *Legionella pneumophila* inhibits superoxide generation in human monocytes via the down-modulation of alpha and beta protein kinase C isotypes. *J Leukoc Biol* **55**:310-2.
58. **Segal, G., and H. A. Shuman.** 1998. How is the intracellular fate of the *Legionella pneumophila* phagosome determined? *Trends Microbiol* **6**:253-5.
59. **Medzhitov, R., and C. Janeway, Jr.** 2000. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol* **8**:452-6.
60. **Friedman, H., Y. Yamamoto, and T. W. Klein.** 2002. *Legionella pneumophila* pathogenesis and immunity. *Semin Pediatr Infect Dis* **13**:273-9.
61. **Winn, W. C., Jr., and R. L. Myerowitz.** 1981. The pathology of the *Legionella* pneumonias. A review of 74 cases and the literature. *Hum Pathol* **12**:401-22.
62. **Rolstad, B., and B. P. Berdal.** 1981. Immune defenses against *Legionella pneumophila* in rats. *Infect Immun* **32**:805-12.
63. **Breiman, R. F., and M. A. Horwitz.** 1987. Guinea pigs sublethally infected with aerosolized *Legionella pneumophila* develop humoral and cell-mediated immune responses and are protected against lethal aerosol challenge. A model for studying host defense against lung infections caused by intracellular pathogens. *J Exp Med* **165**:799-811.
64. **Friedman, H., Y. Yamamoto, C. Newton, and T. Klein.** 1998. Immunologic response and pathophysiology of *Legionella* infection. *Semin Respir Infect* **13**:100-8.
65. **Brieland, J. K., D. G. Remick, M. L. LeGendre, N. C. Engleberg, and J. C. Fantone.** 1998. In vivo regulation of replicative *Legionella pneumophila* lung infection by endogenous interleukin-12. *Infect Immun* **66**:65-9.
66. **Skerrett, S. J., G. J. Bagby, R. A. Schmidt, and S. Nelson.** 1997. Antibody-mediated depletion of tumor necrosis factor-alpha impairs pulmonary host defenses to *Legionella pneumophila*. *J Infect Dis* **176**:1019-28.
67. **Stout, J. E., and V. L. Yu.** 1997. Legionellosis. *N Engl J Med* **337**:682-7.
68. **Tossa, P., M. Deloge-Abarkan, D. Zmirou-Navier, P. Hartemann, and L. Mathieu.** 2006. Pontiac fever: an operational definition for epidemiological studies. *BMC Public Health* **6**:112.
69. **Burnsed, L. J., L. A. Hicks, L. M. Smithee, B. S. Fields, K. K. Bradley, N. Pascoe, S. M. Richards, S. Mallonee, L. Littrell, R. F. Benson, and M. R. Moore.** 2007. A

- large, travel-associated outbreak of legionellosis among hotel guests: utility of the urine antigen assay in confirming Pontiac fever. *Clin Infect Dis* **44**:222-8.
70. **Edelstein, P. H.** 2007. Urine antigen tests positive for Pontiac fever: implications for diagnosis and pathogenesis. *Clin Infect Dis* **44**:229-31.
71. **Sopena, N., M. Sabria-Leal, M. L. Pedro-Botet, E. Padilla, J. Dominguez, J. Morera, and P. Tudela.** 1998. Comparative study of the clinical presentation of *Legionella* pneumonia and other community-acquired pneumonias. *Chest* **113**:1195-200.
72. **Falco, V., T. Fernandez de Sevilla, J. Alegre, A. Ferrer, and J. M. Martinez Vazquez.** 1991. *Legionella pneumophila*. A cause of severe community-acquired pneumonia. *Chest* **100**:1007-11.
73. **Fang, G. D., M. Fine, J. Orloff, D. Arisumi, V. L. Yu, W. Kapoor, J. T. Grayston, S. P. Wang, R. Kohler, R. R. Muder, and et al.** 1990. New and emerging etiologies for community-acquired pneumonia with implications for therapy. A prospective multicenter study of 359 cases. *Medicine (Baltimore)* **69**:307-16.
74. **Johnson, J. D., M. J. Raff, and J. A. Van Arsdall.** 1984. Neurologic manifestations of Legionnaires' disease. *Medicine (Baltimore)* **63**:303-10.
75. **Kirby, B. D., K. M. Snyder, R. D. Meyer, and S. M. Finegold.** 1980. Legionnaires' disease: report of sixty-five nosocomially acquired cases of review of the literature. *Medicine (Baltimore)* **59**:188-205.
76. **Yu, V. L., F. J. Kroboth, J. Shonnard, A. Brown, S. McDearman, and M. Magnussen.** 1982. Legionnaires' disease: new clinical perspective from a prospective pneumonia study. *Am J Med* **73**:357-61.
77. **Sabria, M., and M. Campins.** 2003. Legionnaires' disease: update on epidemiology and management options. *Am J Respir Med* **2**:235-43.
78. **Lowry, P. W., and L. S. Tompkins.** 1993. Nosocomial legionellosis: a review of pulmonary and extrapulmonary syndromes. *Am J Infect Control* **21**:21-7.
79. **Tompkins, L. S., B. J. Roessler, S. C. Redd, L. E. Markowitz, and M. L. Cohen.** 1988. *Legionella* prosthetic-valve endocarditis. *N Engl J Med* **318**:530-5.
80. **Singh, N., R. R. Muder, V. L. Yu, and T. Gayowski.** 1993. Legionella infection in liver transplant recipients: implications for management. *Transplantation* **56**:1549-51.
81. **Muder, R. R., V. L. Yu, and M. F. Parry.** 1987. The radiologic manifestations of *Legionella* pneumonia. *Semin Respir Infect* **2**:242-54.
82. **Vergis, E. N., V. L. Yu, and A. P. Fishman.** 1997. Legionellosis, 3rd ed, New York.
83. **Kroboth, F. J., V. L. Yu, S. C. Reddy, and A. C. Yu.** 1983. Clinicoradiographic correlation with the extent of Legionnaire disease. *AJR Am J Roentgenol* **141**:263-8.
84. **Edelstein, P. H., R. D. Meyer, and S. M. Finegold.** 1980. Laboratory diagnosis of Legionnaires' disease. *Am Rev Respir Dis* **121**:317-27.
85. **Fields, B. S., R. F. Benson, and R. E. Besser.** 2002. Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* **15**:506-26.

86. **Den Boer, J. W., and E. P. Yzerman.** 2004. Diagnosis of *Legionella* infection in Legionnaires' disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **23**:871-8.
87. **Lee, T. C., R. M. Vickers, V. L. Yu, and M. M. Wagener.** 1993. Growth of 28 *Legionella* species on selective culture media: a comparative study. *J Clin Microbiol* **31**:2764-8.
88. **Murdoch, D. R., G. J. Light, L. C. Jennings, and S. T. Chambers.** 1999. Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the 5S rRNA gene. *J Clin Microbiol* **37**:281.
89. **Wilson, D. A., U. Reischl, G. S. Hall, and G. W. Procop.** 2007. Use of partial 16S rRNA gene sequencing for identification of *Legionella pneumophila* and non-pneumophila *Legionella* spp. *J Clin Microbiol* **45**:257-8.
90. **Ratcliff, R. M., J. A. Lanser, P. A. Manning, and M. W. Heuzenroeder.** 1998. Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the *mip* gene. *J Clin Microbiol* **36**:1560-7.
91. **Malan, A. K., T. B. Martins, T. D. Jaskowski, H. R. Hill, and C. M. Litwin.** 2003. Comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays with an immunofluorescence assay for detection of *Legionella pneumophila* types 1 to 6. *J Clin Microbiol* **41**:3060-3.
92. **Wilkinson, H. W., D. D. Cruce, and C. V. Broome.** 1981. Validation of *Legionella pneumophila* indirect immunofluorescence assay with epidemic sera. *J Clin Microbiol* **13**:139-46.
93. **De Ory, F., J. M. Echevarria, C. Pelaz, A. Tellez, M. A. Mateo, and J. Lopez.** 2000. Detection of specific IgM antibody in the investigation of an outbreak of pneumonia due to *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Clin Microbiol Infect* **6**:64-9.
94. **Kohler, R. B., W. C. Winn, Jr., and L. J. Wheat.** 1984. Onset and duration of urinary antigen excretion in Legionnaires disease. *J Clin Microbiol* **20**:605-7.
95. **Formica, N., M. Yates, M. Beers, J. Carnie, G. Hogg, N. Ryan, and G. Tallis.** 2001. The impact of diagnosis by legionella urinary antigen test on the epidemiology and outcomes of Legionnaires' disease. *Epidemiol Infect* **127**:275-80.
96. **Williams, A., and M. S. Lever.** 1995. Characterisation of *Legionella pneumophila* antigen in urine of guinea pigs and humans with Legionnaires' disease. *J Infect* **30**:13-6.
97. **Dominguez, J. A., L. Matas, J. M. Manterola, R. Blavia, N. Sopena, F. J. Belda, E. Padilla, M. Gimenez, M. Sabria, J. Morera, and V. Ausina.** 1997. Comparison of radioimmunoassay and enzyme immunoassay kits for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in both concentrated and nonconcentrated urine samples. *J Clin Microbiol* **35**:1627-9.
98. **Dominguez, J., N. Gali, L. Matas, P. Pedroso, A. Hernandez, E. Padilla, and V. Ausina.** 1999. Evaluation of a rapid immunochromatographic assay for the detection of *Legionella* antigen in urine samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **18**:896-8.

99. **Benson, R. F., P. W. Tang, and B. S. Fields.** 2000. Evaluation of the Binax and Biotest urinary antigen kits for detection of Legionnaires' disease due to multiple serogroups and species of *Legionella*. *J Clin Microbiol* **38**:2763-5.
100. **Okada, C., F. Kura, A. Wada, H. Inagawa, G. H. Lee, and H. Matsushita.** 2002. Cross-reactivity and sensitivity of two Legionella urinary antigen kits, Biotest EIA and Binax NOW, to extracted antigens from various serogroups of *L. pneumophila* and other Legionella species. *Microbiol Immunol* **46**:51-4.
101. **Olsen, C. W., P. Elverdal, C. S. Jorgensen, and S. A. Uldum.** 2009. Comparison of the sensitivity of the *Legionella* urinary antigen EIA kits from Binax and Biotest with urine from patients with infections caused by less common serogroups and subgroups of *Legionella*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.
102. **Dominguez, J. A., J. M. Manterola, R. Blavia, N. Sopena, F. J. Belda, E. Padilla, M. Gimenez, M. Sabria, J. Morera, and V. Ausina.** 1996. Detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in nonconcentrated urine and urine concentrated by selective ultrafiltration. *J Clin Microbiol* **34**:2334-6.
103. **Guerrero, C., C. M. Toldos, G. Yague, C. Ramirez, T. Rodriguez, and M. Segovia.** 2004. Comparison of diagnostic sensitivities of three assays (Bartels enzyme immunoassay [EIA], Biotest EIA, and Binax NOW immunochromatographic test) for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine. *J Clin Microbiol* **42**:467-8.
104. **Wilson, D. A., B. Yen-Lieberman, U. Reischl, S. M. Gordon, and G. W. Procop.** 2003. Detection of *Legionella pneumophila* by real-time PCR for the *mip* gene. *J Clin Microbiol* **41**:3327-30.
105. **Murdoch, D. R., E. J. Walford, L. C. Jennings, G. J. Light, M. I. Schousboe, A. Y. Cheresky, S. T. Chambers, and G. I. Town.** 1996. Use of the polymerase chain reaction to detect *Legionella* DNA in urine and serum samples from patients with pneumonia. *Clin Infect Dis* **23**:475-80.
106. **Kessler, H. H., F. F. Reinthaler, A. Pschaid, K. Pierer, B. Kleinhapl, E. Eber, and E. Marth.** 1993. Rapid detection of *Legionella* species in bronchoalveolar lavage fluids with the EnviroAmp *Legionella* PCR amplification and detection kit. *J Clin Microbiol* **31**:3325-8.
107. **Templeton, K. E., S. A. Scheltinga, P. Sillekens, J. W. Crielaard, A. P. van Dam, H. Goossens, and E. C. Claas.** 2003. Development and clinical evaluation of an internally controlled, single-tube multiplex real-time PCR assay for detection of *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species. *J Clin Microbiol* **41**:4016-21.
108. **Stolhaug, A., and K. Bergh.** 2006. 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* **72**:6394-8.

109. **Matsiota-Bernard, P., S. Waser, and G. Vroni.** 2000. Detection of *Legionella pneumophila* DNA in urine and serum samples from patients with pneumonia. Clin Microbiol Infect **6**:223-5.
110. **Diederen, B. M., J. P. Bruin, J. W. den Boer, M. F. Peeters, and E. P. Yzerman.** 2007. Sensitivity of *Legionella pneumophila* DNA detection in serum samples in relation to disease severity. J Med Microbiol **56**:1255.
111. **Murdoch, D. R.** 2003. Diagnosis of *Legionella* infection. Clin Infect Dis **36**:64-9.
112. **Cloud, J. L., K. C. Carroll, P. Pixton, M. Erali, and D. R. Hillyard.** 2000. Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. J Clin Microbiol **38**:1709-12.
113. **Muller, B. P., C.** 2006. Markers of acute inflammation in assessing and managing lower respiratory tract infections: focus on procalcitonin. Clin Microbiol Infect **12**:8-16.
114. **Tateda, K., T. Matsumoto, Y. Ishii, N. Furuya, A. Ohno, S. Miyazaki, and K. Yamaguchi.** 1998. Serum cytokines in patients with *Legionella* pneumonia: relative predominance of Th1-type cytokines. Clin Diagn Lab Immunol **5**:401-3.
115. **Weiss, G., C. Murr, H. Zoller, M. Haun, B. Widner, C. Ludescher, and D. Fuchs.** 1999. Modulation of neopterin formation and tryptophan degradation by Th1- and Th2-derived cytokines in human monocytic cells. Clin Exp Immunol **116**:435-40.
116. **Prat, C., J. Dominguez, F. Andreo, S. Blanco, A. Pallares, F. Cuchillo, C. Ramil, J. Ruiz-Manzano, and V. Ausina.** 2006. Procalcitonin and neopterin correlation with aetiology and severity of pneumonia. J Infect **52**:169-77.
117. **Linscheid, P., D. Seboek, D. J. Schaer, H. Zulewski, U. Keller, and B. Muller.** 2004. Expression and secretion of procalcitonin and calcitonin gene-related peptide by adherent monocytes and by macrophage-activated adipocytes. Crit Care Med **32**:1715-21.
118. **de Jager, C. P., N. C. de Wit, G. Weers-Pothoff, T. van der Poll, and P. C. Wever.** 2009. Procalcitonin kinetics in *Legionella pneumophila* pneumonia. Clin Microbiol Infect.
119. **Haeuptle, J., R. Zaborsky, R. Fiumefreddo, A. Trampuz, I. Steffen, R. Frei, M. Christ-Crain, B. Muller, and P. Schuetz.** 2009. Prognostic value of procalcitonin in *Legionella* pneumonia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **28**:55-60.
120. **Prat, C., A. Lacoma, J. Dominguez, J. Papassotiriou, N. G. Morgenthaler, F. Andreo, P. Tudela, J. Ruiz-Manzano, and V. Ausina.** 2007. Midregional pro-atrial natriuretic peptide as a prognostic marker in pneumonia. J Infect **55**:400-7.
121. **Heath, C. H., D. I. Grove, and D. F. Looke.** 1996. Delay in appropriate therapy of *Legionella* pneumonia associated with increased mortality. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **15**:286-90.
122. **Benin, A. L., R. F. Benson, and R. E. Besser.** 2002. Trends in legionnaires disease, 1980-1998: declining mortality and new patterns of diagnosis. Clin Infect Dis **35**:1039-46.

123. **Mykietiuk, A., J. Carratala, N. Fernandez-Sabe, J. Dorca, R. Verdaguier, F. Manresa, and F. Gudiol.** 2005. Clinical outcomes for hospitalized patients with *Legionella* pneumonia in the antigenuria era: the influence of levofloxacin therapy. *Clin Infect Dis* **40**:794-9.
124. **Plouffe, J. F., R. F. Breiman, B. S. Fields, M. Herbert, J. Inverso, C. Knirsch, A. Kolokathis, T. J. Marrie, L. Nicolle, and D. B. Schwartz.** 2003. Azithromycin in the treatment of *Legionella* pneumonia requiring hospitalization. *Clin Infect Dis* **37**:1475-80.
125. **Yu, V. L., R. N. Greenberg, N. Zadeikis, J. E. Stout, M. M. Khashab, W. H. Olson, and A. M. Tennenberg.** 2004. Levofloxacin efficacy in the treatment of community-acquired legionellosis. *Chest* **125**:2135-9.
126. **Yu, V. L., T. C. Mengan, and S. L. Barriere.** 1998. *Antimicrobial Therapy and Vaccines*, 1st ed, vol. *Legionella* species, Baltimore.
127. **Edelstein, P. H.** 1995. Antimicrobial chemotherapy for legionnaires' disease: a review. *Clin Infect Dis* **21 Suppl 3**:S265-76.
128. **Sabria, M., M. L. Pedro-Botet, J. Gomez, J. Roig, B. Vilaseca, N. Sopena, and V. Banos.** 2005. Fluoroquinolones vs macrolides in the treatment of Legionnaires disease. *Chest* **128**:1401-5.
129. **el-Ebiary, M., X. Sarmiento, A. Torres, S. Nogue, E. Mesalles, M. Bodi, and J. Almirall.** 1997. Prognostic factors of severe *Legionella* pneumonia requiring admission to ICU. *Am J Respir Crit Care Med* **156**:1467-72.
130. **Bornstein, N., D. Marmet, M. Surgot, M. Nowicki, A. Arslan, J. Esteve, and J. Fleurette.** 1989. Exposure to Legionellaceae at a hot spring spa: a prospective clinical and serological study. *Epidemiol Infect* **102**:31-6.
131. **Sabria, M., J. Alvarez, A. Dominguez, A. Pedrol, G. Sauca, L. Salleras, A. Lopez, M. A. Garcia-Nunez, I. Parron, and M. P. Barrufet.** 2006. A community outbreak of Legionnaires' disease: evidence of a cooling tower as the source. *Clin Microbiol Infect* **12**:642-7.
132. **Brown, C. M., P. J. Nuorti, R. F. Breiman, A. L. Hathcock, B. S. Fields, H. B. Lipman, G. C. Llewellyn, J. Hofmann, and M. Cetron.** 1999. A community outbreak of Legionnaires' disease linked to hospital cooling towers: an epidemiological method to calculate dose of exposure. *Int J Epidemiol* **28**:353-9.
133. **Yu, V. L.** 2008. Cooling towers and legionellosis: a conundrum with proposed solutions. *Int J Hyg Environ Health* **211**:229-34.
134. **Parrilla Valero, F., S. Chacon Villanueva, and A. Perez Lleontart.** 2007. [Study of refrigeration towers associated with community outbreaks of legionellosis]. *Gac Sanit* **21**:357-60.
135. **Kirrage, D., G. Reynolds, G. E. Smith, and B. Olowokure.** 2007. Investigation of an outbreak of Legionnaires' disease: Hereford, UK 2003. *Respir Med* **101**:1639-44.
136. 1986. Legionnaires' disease in Staffordshire. *Lancet* **1**:1374.

137. **Garcia, M. T., and C. Pelaz.** 2008. Effectiveness of disinfectants used in cooling towers against *Legionella pneumophila*. *Chemotherapy* **54**:107-16.
138. **Lepine, L. A., D. B. Jernigan, J. C. Butler, J. M. Pruckler, R. F. Benson, G. Kim, J. L. Hadler, M. L. Cartter, and B. S. Fields.** 1998. A recurrent outbreak of nosocomial legionnaires' disease detected by urinary antigen testing: evidence for long-term colonization of a hospital plumbing system. *Infect Control Hosp Epidemiol* **19**:905-10.
139. **Kool, J. L., D. Bergmire-Sweat, J. C. Butler, E. W. Brown, D. J. Peabody, D. S. Massi, J. C. Carpenter, J. M. Pruckler, R. F. Benson, and B. S. Fields.** 1999. Hospital characteristics associated with colonization of water systems by *Legionella* and risk of nosocomial legionnaires' disease: a cohort study of 15 hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol* **20**:798-805.
140. **Cowgill, K. D., C. E. Lucas, R. F. Benson, S. Chamany, E. W. Brown, B. S. Fields, and D. R. Feikin.** 2005. Recurrence of legionnaires disease at a hotel in the United States Virgin Islands over a 20-year period. *Clin Infect Dis* **40**:1205-7.
141. **Sellick, J. A., and J. Mytotte, M.** 1993. Nosocomial *Legionella pneumophila* in a hospital with an instantaneous hot water tank., p. 43-5. *In* J. M. Barbaree, R. F. Breiman, and A. P. Dufour (ed.), *Legionella-current status and emerging perspectives*. American Society for Microbiology, Washington DC.
142. **Muraca, P., J. E. Stout, and V. L. Yu.** 1987. Comparative assessment of chlorine, heat, ozone, and UV light for killing *Legionella pneumophila* within a model plumbing system. *Appl Environ Microbiol* **53**:447-53.
143. **Lin, Y. S., J. E. Stout, V. L. Yu, and R. D. Vidic.** 1998. Disinfection of water distribution systems for *Legionella*. *Semin Respir Infect* **13**:147-59.
144. **Freije, M. R.** 1996. *Legionellae control in health care facilities. A guide for minimizing risk*. HC Information Resources Indianapolis.
145. **Biurrun, A., L. Caballero, C. Pelaz, E. Leon, and A. Gago.** 1999. Treatment of a *Legionella pneumophila*-colonized water distribution system using copper-silver ionization and continuous chlorination. *Infect Control Hosp Epidemiol* **20**:426-8.
146. **Moreno, C., I. de Blas, F. Miralles, D. Apraiz, and V. Catalan.** 1997. A simple method for the eradication of *Legionella pneumophila* from potable water systems. *Can J Microbiol* **43**:1189-96.
147. **Modol, J., M. Sabria, E. Reynaga, M. L. Pedro-Botet, N. Sopena, P. Tudela, I. Casas, and C. Rey-Joly.** 2007. Hospital-acquired legionnaires disease in a university hospital: impact of the copper-silver ionization system. *Clin Infect Dis* **44**:263-5.
148. **Stout, J. E., and V. L. Yu.** 2003. Experiences of the first 16 hospitals using copper-silver ionization for *Legionella* control: implications for the evaluation of other disinfection modalities. *Infect Control Hosp Epidemiol* **24**:563-8.

149. **Pianetti, A., L. Sabatini, B. Citterio, E. Sisti, L. Pierfelici, and F. Bruscolini.** 2008. Inactivation of *Legionella pneumophila* by combined systems of copper and silver ions and free chlorine. *Ig Sanita Pubbl* **64**:27-40.
150. **Jansa, J. M., J. A. Cayla, D. Ferrer, J. Gracia, C. Pelaz, M. Salvador, A. Benavides, T. Pellicer, P. Rodriguez, J. M. Garces, A. Segura, J. Guix, and A. Plasencia.** 2002. An outbreak of Legionnaires' disease in an inner city district: importance of the first 24 hours in the investigation. *Int J Tuberc Lung Dis* **6**:831-8.
151. **Ta, A. C., J. E. Stout, V. L. Yu, and M. M. Wagener.** 1995. Comparison of culture methods for monitoring *Legionella* species in hospital potable water systems and recommendations for standardization of such methods. *J Clin Microbiol* **33**:2118-23.
152. **Leoni, E., and P. P. Legnani.** 2001. Comparison of selective procedures for isolation and enumeration of *Legionella* species from hot water systems. *J Appl Microbiol* **90**:27-33.
153. **Tobin, J. O., R. A. Swann, and C. L. Bartlett.** 1981. Isolation of *Legionella pneumophila* from water systems: methods and preliminary results. *Br Med J (Clin Res Ed)* **282**:515-7.
154. **Joly, J. R., R. M. McKinney, J. O. Tobin, W. F. Bibb, I. D. Watkins, and D. Ramsay.** 1986. Development of a standardized subgrouping scheme for *Legionella pneumophila* serogroup 1 using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* **23**:768-71.
155. **Stout, J. E., J. Joly, M. Para, J. Plouffe, C. Ciesielski, M. J. Blaser, and V. L. Yu.** 1988. Comparison of molecular methods for subtyping patients and epidemiologically linked environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J Infect Dis* **157**:486-95.
156. **Tyler, K. D., G. Wang, S. D. Tyler, and W. M. Johnson.** 1997. Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *J Clin Microbiol* **35**:339-46.
157. **Fry, N. K., J. M. Bangsberg, S. Bernander, J. Etienne, B. Forsblom, V. Gaia, P. Hasenberger, D. Lindsay, A. Papoutsis, C. Pelaz, M. Struelens, S. A. Uldum, P. Visca, and T. G. Harrison.** 2000. Assessment of intercentre reproducibility and epidemiological concordance of *Legionella pneumophila* serogroup 1 genotyping by amplified fragment length polymorphism analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19**:773-80.
158. **Jonas, D., H. G. Meyer, P. Matthes, D. Hartung, B. Jahn, F. D. Daschner, and B. Jansen.** 2000. Comparative evaluation of three different genotyping methods for investigation of nosocomial outbreaks of Legionnaires' disease in hospitals. *J Clin Microbiol* **38**:2284-91.
159. **Kohler, R. B., S. E. Zimmerman, E. Wilson, S. D. Allen, P. H. Edelstein, L. J. Wheat, and A. White.** 1981. Rapid radioimmunoassay diagnosis of Legionnaires' disease: detection and partial characterization of urinary antigen. *Ann Intern Med* **94**:601-5.



160. **Tilton, R. C.** 1979. Legionnaires' disease antigen detected by enzyme-linked immunosorbent assay. *Ann Intern Med* **90**:697-8.
161. **Harrison, T., S. Uldum, S. Alexiou-Daniel, J. Bangsborg, S. Bernander, Dra, sbreve, V. ar, J. Etienne, J. Helbig, D. Lindsay, I. Lochman, T. Marques, F. de Ory, I. Tartakovskii, G. Wewalka, and F. Fehrenbach.** 1998. A multicenter evaluation of the Biotest *Legionella* urinary antigen EIA. *Clin Microbiol Infect* **4**:359-365.
162. **Dominguez, J. A., N. Gali, P. Pedroso, A. Fargas, E. Padilla, J. M. Manterola, and L. Matas.** 1998. 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* **36**:2718-22.
163. **Helbig, J. H., S. A. Uldum, P. C. Luck, and T. G. Harrison.** 2001. Detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine samples by the BinaxNOW immunochromatographic assay and comparison with both Binax *Legionella* Urinary Enzyme Immunoassay (EIA) and Biotest *Legionella* Urin Antigen EIA. *J Med Microbiol* **50**:509-16.
164. **Diederens, B. M., and M. F. Peeters.** 2007. Evaluation of the SAS *Legionella* Test, a new immunochromatographic assay for the detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine. *Clin Microbiol Infect* **13**:86-8.
165. **Diederens, B. M., and M. F. Peeters.** 2006. Evaluation of Rapid U *Legionella* Plus Test, a new immunochromatographic assay for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **25**:733-5.
166. **Diederens, B. M., and M. F. Peeters.** 2006. Evaluation of two new immunochromatographic assays (Rapid U *Legionella* antigen test and SD Bioline *Legionella* antigen test) for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine. *J Clin Microbiol* **44**:2991-3.
167. **Blanco, S., C. Prat, M. A. Pallares, L. Matas, and J. Dominguez.** 2004. Centrifugal ultrafiltration method for rapid concentration of *Legionella pneumophila* urinary antigen. *J Clin Microbiol* **42**:4410.
168. **Rello, J., T. Lisboa, M. Lujan, M. Gallego, C. Kee, I. Kay, D. Lopez, and G. W. Waterer.** 2009. Severity of pneumococcal pneumonia associated with genomic bacterial load. *Chest* **136**:832-40.
169. **Dominguez, J., N. Gali, S. Blanco, P. Pedroso, C. Prat, L. Matas, and V. Ausina.** 2001. Assessment of a new test to detect *Legionella* urinary antigen for the diagnosis of Legionnaires' Disease. *Diagn Microbiol Infect Dis* **41**:199-203.
170. **Harrison, T. G., and N. Doshi.** 2001. Evaluation of the Bartels *Legionella* Urinary Antigen enzyme immunoassay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **20**:738-40.

171. **Maurin, M., L. Hammer, B. Gestin, J. F. Timsit, O. Rogeaux, F. Delavena, J. Tous, O. Epaulard, J. P. Brion, and J. Croize.** Quantitative real-time PCR tests for diagnostic and prognostic purposes in cases of legionellosis. *Clin Microbiol Infect* **16**:379-84.
172. **Franzin, L., and D. Cabodi.** 2005. *Legionella* pneumonia and serum procalcitonin. *Curr Microbiol* **50**:43-6.
173. **Luck, P. C., and B. Liebscher.** 2003. Detection of *Legionella pneumophila* in water samples by quantitative culture and an antigen detection assay. *Int J Hyg Environ Health* **206**:201-4.
174. **Steinert, M., L. Emody, R. Amann, and J. Hacker.** 1997. Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol* **63**:2047-53.
175. **Salloum, G., H. Meugnier, M. Reyrolle, F. Grimont, P. A. Grimont, J. Etienne, and J. Freney.** 2002. Identification of *Legionella* species by ribotyping and other molecular methods. *Res Microbiol* **153**:679-86.
176. **Van Belkum, A., H. Maas, H. Verbrugh, and N. Van Leeuwen.** 1996. Serotyping, ribotyping, PCR-mediated ribosomal 16S-23S spacer analysis and arbitrarily primed PCR for epidemiological studies on *Legionella pneumophila*. *Res Microbiol* **147**:405-13.
177. **Fry, N. K., S. Warwick, N. A. Saunders, and T. M. Embley.** 1991. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family Legionellaceae. *J Gen Microbiol* **137**:1215-22.
178. **Ko, K. S., H. K. Lee, M. Y. Park, K. H. Lee, Y. J. Yun, S. Y. Woo, H. Miyamoto, and Y. H. Kook.** 2002. Application of RNA polymerase beta-subunit gene (*rpoB*) sequences for the molecular differentiation of *Legionella* species. *J Clin Microbiol* **40**:2653-8.
179. **Liu, H., Y. Li, X. Huang, Y. Kawamura, and T. Ezaki.** 2003. Use of the *dnaJ* gene for the detection and identification of all *Legionella pneumophila* serogroups and description of the primers used to detect 16S rDNA gene sequences of major members of the genus *Legionella*. *Microbiol Immunol* **47**:859-69.
180. **Grattard, F., C. Ginevra, S. Riffard, A. Ros, S. Jarraud, J. Etienne, and B. Pozzetto.** 2006. Analysis of the genetic diversity of *Legionella* by sequencing the 23S-5S ribosomal intergenic spacer region: from phylogeny to direct identification of isolates at the species level from clinical specimens. *Microbes Infect* **8**:73-83.
181. **Su, H. P., S. K. Tung, L. R. Tseng, W. C. Tsai, T. C. Chung, and T. C. Chang.** 2009. Identification of *Legionella* Species by an Oligonucleotide Array. *J Clin Microbiol*.
182. **Ratcliff, R. M.** 2000. Genetic and functional studies of the Mip protein of *Legionella*. University of Adelaide, Adelaide.
183. **Rubin, C. J., M. Thollesson, L. A. Kirsebom, and B. Herrmann.** 2005. Phylogenetic relationships and species differentiation of 39 *Legionella* species by sequence determination of the RNase P RNA gene *rnpB*. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**:2039-49.

**ANEXOS**

---



# **Artículo 1**





ELSEVIER

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease  
41 (2001) 199–203  
Bacteriology

DIAGNOSTIC  
MICROBIOLOGY  
AND INFECTIOUS  
DISEASE

www.elsevier.com/locate/diagmicrobio

## Assessment of a new test to detect *Legionella* urinary antigen for the diagnosis of Legionnaires Disease

J. Domínguez\*, N. Gal, S. Blanco, P. Pedroso, C. Prat, L. Matas, V. Ausina

*Servei de Microbiologia. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain*

Received 11 June 2001; accepted 24 September 2001

Part of this study was presented at the 11<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases held in Istanbul in April 2001

### Abstract

Given that the rate of mortality by *Legionella* pneumonia increases in incorrectly treated patients, rapid diagnosis and early antibiotic treatment are needed. We have assessed the performance of a new enzyme immunoassay (EIA) test (Bartels Inc. Trinity Biotech Company, Wicklow, Ireland) to detect *Legionella pneumophila* antigen in urine comparing it to Binax EIA (Binax, Portland, Maine). We also evaluated the capability of both EIAs to detect extracted soluble antigens of *Legionella* strains. Using nonconcentrated urine samples (NCU) the sensitivity of Bartels EIA was 74.1% (66/89) and the sensitivity of Binax EIA was 51.7% (46/89). The sensitivity of both EIA tests were 91.5% (54/59) using concentrated urine samples (CU). Specificity of both EIA tests was 100% in NCU and CU. Bartels EIA was able to detect all serogroup *L. pneumophila* antigens, achieving a higher sensitivity in the case of *L. pneumophila* serogroup 1 soluble antigen. The new EIA was found to be a useful test for the rapid diagnosis of *Legionella* pneumonia, being a better alternative to the Binax EIA if NCU is used. © 2001 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Pneumonia still remains one of the most common type of infection managed by healthcare providers, and it is caused by a wide variety of microorganisms. Consequently, different antibiotic regimens are required, and in order to choose an optimal treatment, a correct etiologic diagnosis is necessary. Although *Legionella pneumophila* ranks among the most common microbial pathogens involved, diagnosis of *Legionella* pneumonia can be difficult (Edelstein, 1993). Clinical manifestations, and radiographic features are nonspecific, and conventional laboratory tests present known drawbacks (Edelstein, 1987). Given that the rate of mortality by *Legionella* pneumonia increases significantly in incorrectly treated patients, particularly in immunocompromised patients, rapid diagnosis and early antibiotic treatment are needed (Stout & Yu, 1997). The usefulness of urinary antigen detection providing diagnosis of Legionnaires disease has been well documented (Edelstein, 1993; Stout & Yu, 1997). In addition, the use of concentrated urine (CU) improves the sensitivity significantly (Dominguez

et al., 1996). *Legionella* urinary antigen test has been included into the panel recommended in guidelines for the community-acquired pneumonia management recommended by several societies (Bartlett et al., 2000; Mandell et al., 2000). Nevertheless, although *L. pneumophila* serogroup 1 is the dominant cause of Legionellosis in most areas, pneumonia due to other *Legionella* species has been reported, affecting the usefulness of these tests (Waterer et al., 2001). Therefore, a negative urinary antigen does not exclude a *Legionella* infection. The clear benefit provided by *Legionella* urinary antigen detection in the patient management justifies the study of new urinary diagnostic tests. We have assessed the performance of a new enzyme immunoassay test to detect *L. pneumophila* antigen in urine (Bartels EIA *Legionella* Urinary Antigen. Bartels Inc., A Trinity Biotech Company, Wicklow, Ireland).

### 2. Materials and methods

#### 2.1. Patients and samples

First, we studied 42 urine samples from 42 patients with pneumonia caused by *L. pneumophila*. Legionnaires disease was diagnosed by isolating *L. pneumophila* from re-

\* Corresponding author. Tel.: +1-34-93-497-88-94; fax: +1-34-93-497-88-95.

E-mail address: jadoming@ns.hugtip.scs.es (J. A. Dominguez).

spiratory specimens in 12 patients, by seroconversion in 27 patients, and by culture plus seroconversion in 3 patients. Isolation of *L. pneumophila* was done on selective BCYE- $\alpha$  medium, and identification was based on the usual criteria. Detection of specific antibodies was carried out by indirect immunofluorescence (Edelstein, 1997) for at least two serum samples, one obtained during the initial phase of disease and one obtained during convalescence (3 to 9 weeks); the criterion for seroconversion was a fourfold increase in antibody titer.

The second group consisted of 47 urine samples from 47 patients with legionnaires' disease. Patients were diagnosed by detection of soluble antigen from *L. pneumophila* serogroup 1 in CU by Binax EIA (*Legionella* Urinary Antigen EIA, Binax, Portland, Maine) although without either a positive culture or seroconversion.

The third group included 49 urine samples from 49 patients with pneumonia of other etiologies (21 *Streptococcus pneumoniae*, 6 *Chlamydia pneumoniae*, 11 *Mycoplasma pneumoniae*, 4 *Coxiella burnetii*, and 7 *Haemophilus influenzae*). Etiologic diagnosis was achieved by the following methods: standard laboratory methods were used for culture and identification of isolates of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* from blood, sputum and uncontaminated lower respiratory tract secretions, as well as detection of pneumococcal urinary antigen by counterimmunoelectrophoresis. Two serum samples obtained in acute phase and at 3–9 weeks were tested for detection of antibodies against *C. pneumoniae* by microimmunofluorescence, against *M. pneumoniae* by gelatin particle agglutination test and against *C. burnetii* by immunofluorescence test.

The fourth group consisted of 73 urine samples from 73 patients with neither clinical nor radiologic signs of pneumonia, 44 of whom had bacteremia from a non respiratory focus (1 *Bacteroides fragilis*, 3 *Candida albicans*, 2 *Citrobacter freundii*, 2 *Enterobacter cloacae*, 8 *Escherichia coli*, 2 *Enterococcus faecalis*, 2 *Klebsiella oxytoca*, 2 *Klebsiella pneumoniae*, 1 *Listeria monocytogenes*, 1 *Morganella morganii*, 7 *Pseudomonas aeruginosa*, 3 *Streptococcus mitis*, 1 *Streptococcus agalactiae*, 1 *Streptococcus anginosus*, 4 *Staphylococcus aureus*, 1 *Salmonella enteritidis*, 1 *Serratia marcescens*, 1 *Streptococcus sanguis*, and 1 streptococcus oral group), and 29 of whom had urinary tract infections (7 *E. coli*, 3 *Proteus mirabilis*, 2 *Klebsiella sp.*, 2 *C. freundii*, 2 *Enterobacter aerogenes*, 1 *Staphylococcus saprophyticus*, 2 *P. aeruginosa*, 1 *E. faecalis*, 2 *M. morganii*, 1 *C. albicans*, 1 *S. agalactiae*, 1 mixed infection *P. mirabilis* and *E. coli*, 1 *E. coli* and *C. freundii*, 1 *E. coli* and *E. faecalis*, 1 *E. coli* and *C. albicans*, and 1 *E. coli* and *S. agalactiae*). The urine specimens of the patients with urinary tract infections yielded between 50,000 to  $> 10^5$  bacteria or fungi/ml.

The samples were boiled for 5 min and centrifuged at 1,000g for 15 min to prevent nonspecific reactions. The antigen present in urine was concentrated 25-fold by selective ultrafiltration (Uri I-10 Concentrator, Millipore Corporation, Bedford). This sample treatment protocol is not con-

sidered in the manufacturer procedures. Samples were tested by Binax EIA immediately and then frozen to  $-70^\circ\text{C}$ . Samples were tested by Bartels EIA after being stored from 1 to 18 months.

## 2.2. Soluble antigen preparation

Soluble antigens of *Legionella* ATCC strains (*L. pneumophila* serogroups 1 through 14, *Legionella bozemanii*, and *Legionella longbeachae*) were prepared as follows. Each *Legionella* strain was grown on BCYE- $\alpha$  agar at  $35^\circ\text{C}$  for 48 h in 3%  $\text{CO}_2$  and harvested in 3 mL of 0.05M phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4). The cell suspensions were boiled for 5 min and the supernatants were collected. Soluble antigen suspensions were tested in triplicate.

## 2.3. Bartels ELISA *Legionella* urinary antigen

The Bartels assay is a direct sandwich test that uses polyclonal rabbit antibodies which react with *L. pneumophila* serogroup 1 antigen as the capture and detection antibody. Results were read using a microplate reader, although a visual interpretation was possible. Samples were considered positive when ratios were higher than 4 (the absorbance value was 4 times the absorbance value of the negative control). The test was performed following the manufacturer's instructions.

## 2.4. Binax EIA *Legionella* urinary antigen

The Binax test is a direct sandwich assay that uses polyclonal rabbit immunoglobulin G specific for *L. pneumophila* serogroup 1 as the capture and detection antibody. The test was performed following the manufacturer's instructions. Samples were considered positive when the absorbance units were triple than those recorded for the negative control.

## 2.5. Statistical analysis

Data were studied by the SPSS statistics program. Results from nonconcentrated urine (NCU) samples using both EIA tests, and results from concentrated and NCU samples using both EIA tests were compared by means of the two-related samples test by Wilcoxon test.

## 3. Results

### 3.1. Detection of *Legionella* antigens in patient urines

Using Bartels EIA, soluble antigen was detected in 34/42 (80.9%) NCU from Group 1 patients, and in 32/47 (68.1%) NCU from Group 2 patients. Using Binax EIA, soluble antigen was detected in 27/42 (64.3%) and in 19/47 (40.4%)



Table 1  
Bartels EIA and Binax EIA results with nonconcentrated urine samples from patients diagnosed of legionnaires disease (group 1 and 2)

Test	Sensitivity (n of positive/total n)				
	Group 1			Group 2	
	Total	Positive culture	Seroconversion	Culture + serology	
<b>Bartels EIA</b>	80.9 (34/42)	100 (12/12)	70.4 (19/27)	100 (3/3)	68.1 (32/47)
<b>Binax EIA</b>	64.3 (27/42)	83.3 (10/12)	55.5 (15/27)	66.6 (2/3)	40.4 (19/47)

NCU samples from groups 1 and 2, respectively (Table 1). The overall sensitivity of Bartels EIA was 74.1% (66/89) and the overall sensitivity of Binax EIA was 51.7% (46/89).

NCU from patients with no clinical symptoms or signs of pneumonia or with pneumonia of other etiologies were all negative. Specificity for both EIA tests was 100% in NCU.

In order to assess whether the concentration of antigen present in urine samples improves yield, we concentrated 18 urine samples from Group 1, 41 from Group 2, 45 from Group 3 and 62 from Group 4. The sensitivities for these NCU samples in Group 1 and 2 were 66.7% (12/18) and 68.3% (28/41) by Bartels EIA, and 55.5% (10/18) and 39% (16/41) by Binax EIA, respectively, while the sensitivities for CU samples in Group 1 and 2 were 72.2% (13/18) and 100% (41/41) by Bartels EIA and Binax EIA, respectively (Table 2). Using concentrated samples the specificity for both EIA tests was 100%.

The ratios of samples from patients with diagnosis of legionellosis (Group 1 and 2) obtained by Bartels EIA in NCU (median: 11.250; 5 95 percentiles: 0.805 61.330) and CU (median: 42.00; 5 95 percentiles: 1.100 62.900) were significantly higher ( $p < 0.0001$ ) than the ratios obtained by Binax EIA in NCU (median: 2.575; 5 95 percentiles: 0.634 24.055) and CU (median: 11.770; 5 95 percentiles: 1.210 36.450).

Table 2  
Bartels EIA and Binax EIA sensitivities with nonconcentrated urine (NCU) and concentrated urine (CU) samples from groups 1 and 2 patients

Test and samples	Sensitivity (n of positive samples/total n)				
		Group 1			Group 2
		Total	Positive culture	Serconversion	
<b>Bartels EIA</b>	NCU	66.7 (12/18)	100 (2/2)	62.5 (10/16)	68.3 (28/41)
	CU	72.2 (13/18)	100 (2/2)	68.7 (11/16)	100 (41/41)
<b>Binax EIA</b>	NCU	55.5 (10/18)	100 (2/2)	50 (8/16)	39 (16/41)
	CU	72.2 (13/18)	100 (2/2)	68.7 (11/16)	100 (41/41)

Table 3  
Limit detection of Bartels EIA and Binax EIA to detect soluble *Legionella* antigen

Soluble antigen from:	Limit detection (cfu/ml)		
		Binax EIA	Bartels EIA
<i>Legionella pneumophila</i>	<b>1</b>	$1.3 \times 10^5$	$1.3 \times 10^4$
	<b>2</b>	$1.3 \times 10^8$	$1.3 \times 10^7$
	<b>3</b>	$4 \times 10^8$	$4 \times 10^7$
	<b>4</b>	$3 \times 10^8$	$3 \times 10^7$
	<b>5</b>	$3.5 \times 10^8$	$3.5 \times 10^7$
	<b>6</b>	$3.8 \times 10^8$	$3.8 \times 10^7$
	<b>7</b>	$5 \times 10^8$	$5 \times 10^6$
	<b>8</b>	$9 \times 10^7$	$9 \times 10^6$
	<b>9</b>	$8 \times 10^7$	$8 \times 10^6$
	<b>10</b>	$7.8 \times 10^8$	$7.8 \times 10^7$
	<b>11</b>	$1.7 \times 10^8$	$1.7 \times 10^7$
	<b>12</b>	$2 \times 10^8$	$2 \times 10^7$
	<b>13</b>	$7.2 \times 10^8$	$7.2 \times 10^7$
	<b>14</b>	$7 \times 10^7$	$7 \times 10^6$
<i>Legionella bozemanii</i>		$2.9 \times 10^8$	
<i>Legionella longbeachae</i>			

files: 0.634 24.055) and CU (median: 11.770; 5 95 percentiles: 1.210 36.450).

Concentrating urine by selective ultra filtration increased the number of detections of legionellosis, either by Bartels EIA and Binax EIA, in patients with legionnaires disease. In addition, the ratios of samples from patients diagnosed of legionellosis obtained by the Bartels EIA and Binax EIA were significantly higher ( $p < 0.0001$ ) for CU than for NCU in both assays. There were significant differences between Bartels EIA and the Binax EIA regarding its capability to detect *L. pneumophila* antigen in NCU samples.

### 3.2. Detection of *Legionella*-soluble antigens from culture extracts

The Bartels EIA and Binax EIA were tested for their capability of detecting soluble antigens of *Legionella*. Using the boiled supernatants directly, in the 14 serogroups from *L. pneumophila* ATCC strain both tests were positive, in the *L. bozemanii* ATCC strains only Binax EIA gave positive results, and in the *L. longbeachae* ATCC strain both tests were negative.

The detection limit of both techniques to detect soluble *L. pneumophila* serogroup 1 antigen was determined using serial dilutions of the boiled supernatants. Based on the bacterial cell number prior to boil, the detection limit was determined as  $1.3 \times 10^4$  cfu/mL using Bartels EIA. Nevertheless, the detection limit using Binax EIA was  $1.3 \times 10^5$  cfu/ml.

With respect to the remaining *Legionella* ATCC strains, Bartels EIA was more sensitive than Binax EIA in detecting soluble antigen from *L. pneumophila* serogroups 2 14 (Table 3).

#### 4. Discussion

Urinary antigen test to detect *Legionella* antigen has proven the most powerful method for legionnaires disease diagnosis. Several authors have confirmed the usefulness of detecting *L. pneumophila* antigen in urine, initially using in-house radioimmunoassay and EIA techniques (Tilton, 1979; Kolher et al., 1981), although these tests were out of reach for many conventional laboratories. Fortunately, the adaptation in commercially available EIA tests has allowed a wide diffusion of these techniques. The first evaluations using these kits have found them to be specific, sensitive and valuable tests in the prompt diagnosis of legionellosis, providing results in 3 to 4 h (Harrison et al., 1998; Dominguez et al., 1998; Benson et al., 2000).

Recently, a rapid immunochromatographic membrane assay (ICT) has been developed to detect *L. pneumophila* in urine samples in 15 min, and the results obtained with this assay are similar to those reported for EIA tests (Dominguez et al., 1999). The ICT considerably reduces the time needed to detect antigen, and it is technically less complex and requires less equipment than the EIA tests, allowing its use in laboratories without specialized equipment. Nevertheless, very weak band results should be interpreted cautiously (Helbig et al., 2001).

Although the sensitivity of these tests increases significantly when CU by selective ultrafiltration is used (Dominguez et al., 1996, 1998, 1999), and urine concentration is easy to perform and results can be available within one working day, some laboratories use only NCU considering urine concentration a time consuming procedure. With regard to this, in our study, although the urine antigen concentration by selective ultrafiltration increases significantly the sensitivity of the assays, the sensitivity of Bartels EIA was significantly higher than Binax EIA when NCU were used. On the other hand, it seems that a long-term storage of urine leads to a decrease in sensitivity for Binax EIA (Chang et al., 1996). In our experience, we did not detect any discrepancy in the results by a possible instability of the antigen when frozen.

During the last years (Harrison et al., 1998; Benson et al., 2000) it has been proven that the two previous available EIA: Binax EIA and Biotest EIA (Biotest AG, Dreieich, Germany), are capable to detect urinary antigen from *Legionella* non *L. pneumophila* serogroup 1. However, overall sensitivity detecting *L. pneumophila* serogroup 1 was higher than when detecting other *Legionella*. Helbig et al. (2001) using simulated urine samples prepared from ultrasonicated *L. pneumophila* serogroup 1 (strains Philadelphia 1, OLDA and Bellingham), serogroup 3 and serogroup 6, found that the ICT test, the Binax EIA and the Biotest EIA were able to detect antigen, being the lowest limit of detection for these simulated samples for the *L. pneumophila* serogroup 1 strain Philadelphia ( $3 \times 10^4$  sonicated bacteria per ml). All three assays could only recognize *L. pneumophila* serogroups 3 and 6 at concentrations higher than  $5 \times 10^6$

sonicated bacteria per ml. In our study, Bartels EIA was able to detect all serogroups of *L. pneumophila* tested, detecting with higher sensitivity soluble antigen from *L. pneumophila* serogroup 1. In addition, Bartels EIA was able to detect a lesser amount of *L. pneumophila* serogroup 1 ATCC strain antigen than Binax EIA. The different concentration found with respect to the Helbig et al. (2001) study should be caused by the antigen extraction method.

Although the available tests are able to detect urinary antigen of all serogroups of *L. pneumophila* and the other species, it is clear that the best sensitivity is achieved when detecting *L. pneumophila* serogroup 1, correlating with the fact that the usefulness of urinary antigen testing to diagnose *Legionella* infection decreases as the prevalence of serogroup 1 falls (Waterer et al., 2001). Although it is well known that the antigen detected by these tests is lipopolysaccharide (LPS) (Williams et al., 1995), and a common epitope on the LPS has been recognized (Barthe et al., 1988), it has been described that non-pneumophila *Legionella* strains possessed an individual and characteristic LPS banding pattern (Jürgens & Fehrenbach, 1997). Therefore, although a cross-reaction between serogroups have been observed, tests manufactured to detect *L. pneumophila* serogroup 1 could not reach an identical sensitivity for all serogroups. Furthermore, the Biotest EIA manufactured to detect all the serogroups of *L. pneumophila* as well as antigens from other *L. pneumophila* species do not detect non-pneumophila *Legionella* strains as efficiently as *L. pneumophila* serogroup 1 (Harrison et al., 1998; Benson et al., 2000). The reasons remain to be defined, but an exclusion from passage across the walls of the glomerular capillaries avoiding the excretion in urine of these antigens or less immunogenic antigens could be the causes. Testing soluble antigen suspensions from *Legionella* strains only provides information about the capability of antigen detection of the assays. The real concentration of antigen released and achieved in the urine samples is unknown. In order to know the real sensitivity of this test in detecting infections caused by other *Legionella* than *L. pneumophila* serogroup 1, a clinical trial using urine samples from patients should be performed.

Detection of *Legionella* nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) is a promising tool for diagnosing infections due to all *Legionella* species and serogroups (Maiwald et al., 1995). Unfortunately, the reagents for these tests are not standardized and their use is restricted to reference laboratories. Furthermore, the difficulties in interpreting positive PCR results avoid the routine use in clinical microbiology.

In summary, the new EIA evaluated was a rapid, sensitive and specific test to diagnose legionnaires disease. In our experience, the Bartels EIA has been a useful test for the rapid diagnosis of *Legionella* pneumonia, being a better alternative to the Binax EIA if NCU is used.

## Acknowledgments

We thank Dr. O. Jimenez for his kind help in performing the statistical analysis of our data.

## References

- Barthe, C., Joly, J. R., Ramsay, D., Boissinot, M., & Benhamou, N. (1988). Common epitope on the lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* recognized by a monoclonal antibody. *Journal of Clinical Microbiology*, *26*, 1016–1023.
- Bartlett, J. G., Dowell, S. F., Mandell, L. A., File, T. M., Musher, D. M., & Fine, M. J. (2000). Practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clinical Infectious Diseases*, *31*, 347–382.
- Benson RF, Tang PW, Fields B (2000). Evaluation of the Binax and Biotest urinary antigen kits for detection of Legionnaires disease due to multiple serogroups and species of *Legionella*. *Journal of Clinical Microbiology*, *38*, 2763–2765.
- Chang, F. Y., Stout, J. E., & Yu, V.L. (1996). Assessment of enzyme immunoassay versus radioimmunoassay for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in frozen urine specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, *34*, 2628–2629.
- Dominguez, J., Manterola, J. M., Blavia, R., Sopena, N., Belda, F. J., Padilla, E., Gimenez, M., Sabriá, M., Morera, J., & Ausina, V. (1996). Detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in nonconcentrated urine and urine concentrated by selective ultrafiltration. *Journal of Clinical Microbiology*, *34*, 2334–2336.
- Dominguez, J., Gal, N., Pedroso, P., Fargas, A., Padilla, E., Manterola, J. M., & Matas, L. (1998). Comparison of the Binax *Legionella* urinary antigen enzyme immunoassay (EIA) with the Biotest *Legionella* urinary antigen EIA for detection of *Legionella* antigen in both concentrated and nonconcentrated urine samples. *Journal of Clinical Microbiology*, *36*, 2718–2722.
- Dominguez, J., Gal, N., Matas, L., Pedroso, P., Hernandez, A., Padilla, E., & Ausina, V. (1999). Evaluation of a rapid immunochromatographic assay for the detection of *Legionella* antigen in urine samples. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *18*, 896–898.
- Edelstein, P. H. (1987). Laboratory diagnosis of infections caused by *Legionellae*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *6*, 4–10.
- Edelstein, P. H. (1993). Legionnaires disease. *Clinical Infectious Diseases*, *16*, 741–749.
- Edelstein, P. H. (1997). Detection of antibodies to *Legionella* spp. In N. R. Rose, E. Conway de Macario, J. D. Folds, H. C. Lane & R. M. Nakamura (Eds.), *Manual of clinical laboratory immunology*, 5<sup>th</sup> ed. (pp. 502–509). Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
- Harrison, T., Uldum, S., Alexiou-Daniel, S., Bangsberg, J., Bernander, S., Drasar, V., Etienne, J., Helbig, J., Lindsay, D., Lochman, I., Marques, T., Ory, F., Tartakovskii, I., Wewalka, G., & Fehrenbach, F. (1998). A multicenter evaluation of the Biotest *Legionella* urinary antigen EIA. *Clinical Microbiology and Infection*, *4*, 359–365.
- Helbig, J. H., Uldum, S. A., Lück, P., & Harrison, T. G. (2001). Detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine samples by the BinaxNOW immunochromatographic assay and comparison with both Binax *Legionella* urinary enzyme immunoassay (EIA) and Biotest *Legionella* urinary antigen EIA. *Journal of Medical Microbiology*, *50*, 509–516.
- Jørgensen, D., & Fehrenbach, F. J. (1997). Identification of *Legionella* species by lipopolysaccharide antigen pattern. *Journal of Clinical Microbiology*, *35*, 3054–3057.
- Kolher, R. B., Zimmerman, S. E., Wilson, E., Allen, S. D., Edelstein, P. H., Wheat, L. J., & White, A. (1981). Rapid radioimmunoassay diagnosis of Legionnaires disease. *Annals of Internal Medicine*, *94*, 601–605.
- Maiwald, M., Schill, M., Stockinger, C., Helbig, J. H., Lück, P. C., Witzleb, W., & Sonntag, H. G. (1995). Detection of *Legionella* DNA in human and guinea pig urine samples by the polymerase chain reaction. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *14*, 25–33.
- Mandell, L. A., Marrie, T. J., Grossman, R. F., Chow, A. W., & Hyland, R. H. (2000). Canadian guidelines for the initial management of community-acquired pneumonia: an evidence-based update by the Canadian Infectious Diseases Society and the Canadian Thoracic Society. *Clinical Infectious Diseases*, *31*, 383–421.
- Stout, J. E., & Yu, V. L. (1997). Legionellosis. *The New England Journal of Medicine*, *337*, 682–687.
- Tilton, R.C. (1979). Legionnaires disease antigen detected by enzyme-linked immunosorbent assay. *Annals of Internal Medicine*, *90*, 697–698.
- Waterer, G. W., Baselski, V. S., & Wunderink, R. G. (2001). *Legionella* and community-acquired pneumonia: a review of current diagnostic tests from a clinician's viewpoint. *American Journal of Medicine*, *110*, 41–48.
- Williams, A., & Lever, M. S. (1995). Characterisation of *Legionella pneumophila* antigen in urine of guinea pigs and human with Legionnaires Diseases. *Journal of Infection*, *30*, 13–16.



## **Artículo 2**



## Detection of *Legionella* antigen in nonconcentrated and concentrated urine samples by a new immunochromatographic assay

S. Blanco · A. Lacomá · C. Prat · M. A. Cuesta ·  
L. Fuenzalida · I. Latorre · J. Domínguez

Received: 28 February 2008 / Accepted: 14 May 2008 / Published online: 27 June 2008  
© Springer-Verlag 2008

The availability of commercial urinary antigen tests increased the diagnosis of Legionnaires' disease, and also decreased mortality, possibly as a result of obtaining an earlier diagnosis in the course of disease [1]. Detection of the *Legionella pneumophila* serogroup 1 soluble antigen in urine by the enzyme immunoassay (EIA) has proven to be rapid, sensitive, and specific in the diagnosis of legionellosis [2, 3]. In the last years, rapid immunochromatographic assays (ICT) have been developed to detect *L. pneumophila* serogroup 1 in urine. ICT methods are technically less complex and require less equipment than the EIA, and this allowed a wide diffusion of *Legionella* urinary antigen for conventional laboratories [4, 5]. The objectives of the present study were to evaluate the sensitivity and specificity of the new ICT test Uni-Gold Legionella Urinary Antigen (LUA) test (Trinity Biotech, Wicklow, Ireland) and to compare the results with those of

the Binax Now Legionella Urinary Antigen Test (Binax, Portland, ME).

We evaluated urine samples from three groups of patients: Group 1 comprised of 80 nonconcentrated (NCU) and concentrated urine (CU) samples from patients with pneumonia caused by *L. pneumophila*. All patients were diagnosed by the detection of soluble antigen from *L. pneumophila* serogroup 1 by the Bartels EIA (Trinity Biotech, Wicklow, Ireland) [3]. In addition, five patients were diagnosed by isolating *L. pneumophila* from respiratory specimens, 16 patients by seroconversion, and five patients by culture plus seroconversion. Group 2 included 38 NCU and 33 CU samples from patients with upper respiratory tract infections of other etiologies (13 *Streptococcus pneumoniae*, ten *Mycoplasma pneumoniae*, seven *Haemophilus influenzae*, two *Escherichia coli*, two *Staphylococcus aureus*, one *Chlamydomphila pneumoniae*, one *Coxiella burnetii*, one *Pseudomonas aeruginosa*, one *Proteus mirabilis*) and 22 NCU and CU samples from patients with bacteremia from a nonrespiratory focus (6 *E. coli*, six *S. aureus*, two *Salmonella* sp., two *Enterococcus faecalis*, two *Streptococcus mitis*, one *Candida albicans*, one *Klebsiella pneumoniae*, one *Streptococcus viridans* group, and one *Propionibacterium* sp.). Group 3 consisted of 50 NCU and 20 CU samples from patients with no clinical or radiological signs of pneumonia, who had urinary tract infections (28 with *E. coli*, eight with *Enterococcus* sp., six with *Klebsiella* sp., two with *Enterobacter* sp., two with *C. albicans*, two with *P. aeruginosa*, one with *Proteus mirabilis*, and one with *S. aureus*).

Urine samples were initially boiled for 5 min and then centrifuged at 1,000g for 15 min to reduce nonspecific reactions [6]. The concentration was performed by centrifugal ultrafiltration [7]. The centrifugal filter device combines a low-binding ultrafiltration membrane with a vertical

---

Part of this study was presented at the 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Chicago, Illinois, September 2007.

---

S. Blanco · A. Lacomá · C. Prat · M. A. Cuesta · L. Fuenzalida ·  
I. Latorre · J. Domínguez

Servei de Microbiologia,  
Hospital Universitari Germans Trias i Pujol  
Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans  
Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona,  
CIBER Enfermedades Respiratorias,  
Badalona, Spain

J. Domínguez (✉)

Servei de Microbiologia, Fundació Institut d'Investigació en  
Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol,  
Carretera del Canyet s/n, 08916, Badalona,  
Barcelona, Spain  
e-mail: jadominguez.igtp.germanstrias@gencat.net

housing to provide fast sample processing. The membrane concentrates molecules with molecular weights greater than 10,000 daltons. Water and small molecules penetrate the ultrafiltration membrane as a consequence of centrifugation, while *Legionella* antigen cannot cross the ultrafiltration membrane and is progressively concentrated. Four ml of each NCU were centrifuged to 3,000g for 15 min. The urine sample was concentrated 25-fold by centrifugal ultrafiltration.

After this sample treatment, not described by the manufacturers in their product inserts, both tests were performed. The Uni-Gold LUA methodology is described briefly: four drops of the patient urine sample were added to a test tube, followed by one drop of buffer extraction. The mix was gently agitated, and then the test strip was inserted into the test tube. The colloidal gold conjugated rabbit anti-*Legionella* antibody binds *Legionella* antigen if it is present in the urine sample, and the resulting antigen-antibodies conjugated complexes are captured by immobilized rabbit anti-*Legionella* antibodies, forming the sample line. In addition, immobilized goat anti-rabbit IgG captures excess conjugated antibody, forming the control line. The reaction was read visually at 15 min. The tests were interpreted by the presence or absence of visually detectable lines with a pink to purple color. A positive result includes the detection of both a patient and a control line, while a negative assay produces only the control line. The Binax Now test was performed as previously described [4].

The sensitivity, specificity, and 95% of confidence intervals (CI) were calculated in the usual manner. Agreement between the two tests was estimated by Cohen's Kappa statistic. We used the McNemar test to compare the proportion of negative and positive results among the Uni-Gold LUA and Binax Now tests. Differences were considered to be significant when the *p*-value was less than 0.05. All analyses were performed with the SPSS statistical software package for Windows (SPSS version 15.0, SPSS Inc., Chicago, IL).

By using the Uni-Gold LUA test, soluble antigen was detected in 51 NCU samples (63.75%; 95% CI=52.2–74.2) and in 76 CU samples (95%; 95%CI=87.7–98.6) from the patients of group 1. The Binax Now test detected *Legionella* in 54 NCU (67.50%; 95%CI=56.1–77.6) and in 78 CU

(97.5%; 95%CI=91.3–99.7) samples. NCU samples from patients with upper respiratory tract infections of other etiologies, bacteremia from a nonrespiratory focus, or patients with urinary tract infections (groups 2 and 3) were negative for both tests (100% specificity; 95%CI=96.7–100). After concentration, the specificity was 96% (72/75) (95%CI=88.8–99.2) for the Uni-Gold LUA test and 100% (95%CI=95.2–100) for the Binax Now test. The concordance of both techniques analyzing the three groups of patients in NCU samples was 98.42% ( $k=0.961$ , standard error [s.e.]: 0.023). For the CU samples, the concordance was 97.2% ( $k=0.935$ , s.e.: 0.028) (Table 1). There were no significant differences between the Uni-Gold LUA and Binax results in NCU ( $p=0.250$ ) nor in CU ( $p=0.655$ ) samples.

Since the introduction of tests for the detection of soluble antigens in urine specimens, several authors have confirmed the usefulness of detecting *L. pneumophila* serogroup 1 antigen using commercial EIA techniques [2, 3]. The introduction of the Binax Now test allowed the detection of *L. pneumophila* serogroup 1 in urine samples, reducing the time needed to achieve diagnosis. All of the previous studies have demonstrated no differences between EIA tests and the Binax Now test in detecting *L. pneumophila* serogroup 1 [4, 5].

Recently, other ICT tests have been developed. Diederer and Peeters [8–10] evaluated some of these new assays, comparing the results with those obtained by the Binax Now test. They studied patients diagnosed with Legionnaires' disease and patients with respiratory tract infections. The sensitivity and specificity of the tests using NCU samples were 82.9% and 99% for the SAS Legionella test (SA Scientific, USA), and 31.5% and 98.8% for the SD Bioline Legionella Antigen Test (Standard Diagnostics, Inc., Korea). For the Rapid U Legionella Antigen test (DiaMondial, Sees, France), the sensitivity and specificity ranged between 71.2 and 91.5%, and between 90 and 95.6%, respectively. Clearly, the performance of the SD Bioline test is unacceptable for diagnostic purposes. Our results using the Uni-Gold LUA test were between 63.75% in NCU samples and 95% when CU samples are used. On the other hand, the high sensitivity of the Binax Now test

**Table 1** Comparison of the Uni-Gold LUA results with those of the Binax Now test for the detection of *Legionella* antigen

	Binax Now test results			
	Nonconcentrated urine, <i>n</i> (%)		Concentrated urine, <i>n</i> (%)	
	Positive	Negative	Positive	Negative
Uni-Gold LUA				
Positive	51 (96.2)	0 (0)	76 (97.4)	3 (3.9)
Negative	3 (3.8)	136 (100)	2 (2.6)	74 (96.1)
Total	54 (100)	136 (100)	78 (100)	77 (100)



obtained by Diederer and Peeters [8–10] using NCU samples is surprising (>90%), as this level of sensitivity has been reported only when using concentrated urine [6].

Both ICTs studied are lateral-flow immunochromatographic tests. Both are rapid methods, giving a result in 15 min or less, and are easy to perform. One of the most critical points in the performance of the ICT methods is the reading of the colored lines. The color intensities reached using the Uni-Gold LUA test are similar to those obtained by the Binax Now test, not affecting the final sensitivity and specificity.

The concentration of antigen present in urine by selective ultrafiltration increased the sensitivity [6, 7]. However, it should be pointed out that the concentration procedure is not included in the instruction manual of the manufacturer, and that it is an option which is not followed by all laboratories. In our study, the sensitivity of the Uni-Gold LUA test using CU samples (95%) is comparable with the Binax Now test (97.5%), with the differences not being significant.

As limitations of our study, it could be criticized that the basis of specimen selection was positivity in the Bartels EIA, and, consequently, there might be some positive selection bias towards the Uni-Gold LUA test. However, as we have previously described [3] using as a reference method the culture and the serology, the Bartels EIA had a high sensitivity and specificity in diagnosing *Legionella* infection. Therefore, we have evaluated the new ICT test with an exigent gold standard and, at least in our evaluation, the Uni-Gold LUA test has showed similar characteristics to the Bartels EIA. On the other hand, in order to know the real value of the evaluated test, further population studies would be necessary to analyze the positive and negative predictive values.

In conclusion, the Uni-Gold LUA test is a good alternative for detecting *L. pneumophila* serogroup 1 antigen in urine samples. The test considerably reduces the time needed to perform the detection in comparison with EIA tests and provides levels of sensitivity and specificity similar to those obtained by the Binax Now test.

**Acknowledgment** We would like to thank Trinity Biotech, especially Fiona Campbell (Head of Clinical Affairs), for providing the test kits required for the study.

**Competing interests** None of the investigators have any financial interest in or a financial conflict with the subject matter or materials discussed in this manuscript. None of the manufacturers of the assays evaluated had a role in the study design, conduct, collection, management, analysis, or interpretation of the data, or the preparation, review, or approval of the manuscript.

## References

- Den Boer JW, Yzerman EP (2004) Diagnosis of *Legionella* infection in Legionnaires' disease. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 23:871–878
- Hackman BA, Plouffe JF, Benson RF, Fields BS, Breiman RF (1996) Comparison of Binax Legionella Urinary Antigen EIA kit with Binax RIA Urinary Antigen kit for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen. J Clin Microbiol 34:1579–1580
- Domínguez J, Galí N, Blanco S, Pedroso P, Prat C, Matas L, Ausina V (2001) Assessment of a new test to detect *Legionella* urinary antigen for the diagnosis of Legionnaires' Disease. Diagn Microbiol Infect Dis 41:199–203
- Domínguez J, Galí N, Matas L, Pedroso P, Hernández A, Padilla E, Ausina V (1999) Evaluation of a rapid immunochromatographic assay for the detection of *Legionella* antigen in urine samples. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 18:896–898
- Helbig JH, Uldum SA, Lück PC, Harrison TG (2001) Detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine samples by the Binax-NOW immunochromatographic assay and comparison with both Binax Legionella Urinary Enzyme Immunoassay (EIA) and Biotest Legionella Urin Antigen EIA. J Med Microbiol 50:509–516
- Domínguez JA, Manterola JM, Blavía R, Sopena N, Belda FJ, Padilla E, Giménez M, Sabrià M, Morera J, Ausina V (1996) Detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in nonconcentrated urine and urine concentrated by selective ultrafiltration. J Clin Microbiol 34:2334–2336
- Blanco S, Prat C, Pallarès MA, Matas L, Domínguez J (2004) Centrifugal ultrafiltration method for rapid concentration of *Legionella pneumophila* urinary antigen. J Clin Microbiol 42:4410
- Diederer BM, Peeters MF (2006) Evaluation of two new immunochromatographic assays (Rapid U Legionella antigen test and SD Bioline Legionella antigen test) for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine. J Clin Microbiol 44:2991–2993
- Diederer BM, Peeters MF (2006) Evaluation of Rapid U Legionella Plus Test, a new immunochromatographic assay for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 25:733–735
- Diederer BM, Peeters MF (2007) Evaluation of the SAS Legionella Test, a new immunochromatographic assay for the detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine. Clin Microbiol Infect 13:86–88



# **Artículo 3**



## Letters to the Editor

### Centrifugal Ultrafiltration Method for Rapid Concentration of *Legionella pneumophila* Urinary Antigen

Detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine by enzyme immunoassay (EIA) or by immunochromatographic testing (ICT) has proven rapid, sensitive, and specific for diagnosing legionellosis (2, 3, 5, 6). Although it requires added processing time, the use of concentrated urine (CU) obtained by selective ultrafiltration significantly improves the sensitivity (1) of antigen detection. We assessed the utility of rapid antigen concentration by centrifugal ultrafiltration (Amicon Ultra-4; Millipore Corporation, Bedford, Mass.) and compared it to passive ultrafiltration (Urifil-10; Millipore Corporation).

We tested 35 patients with confirmed *L. pneumophila* infection. Diagnosis was achieved by detection of antigen by the EIA method (Binax, Portland, Maine) using 25-fold CU obtained by passive ultrafiltration. In addition, 35 patients with confirmed pneumonia of other etiologies (15 *Streptococcus pneumoniae* infections, 15 *Mycoplasma pneumoniae* infections, and 5 *Chlamydia pneumoniae* infections) and 15 patients with urinary tract infections (10 *Escherichia coli* infections, 1 *Pseudomonas aeruginosa* infection, 2 *Proteus mirabilis* infections, and 1 *Klebsiella pneumoniae* infection) were examined. These patients were all negative when tested as outlined above.

Prior to the concentration step, all urine samples were initially boiled for 5 min and then centrifuged at  $1,000 \times g$  for 15 min to reduce nonspecific reactions (4). Using the passive ultrafiltration method, 4 ml of urine was introduced into a device equipped with an ultrafiltration membrane. This membrane is permanently sealed into the housing, and the back membrane is in contact with an absorbent pad. Water and small molecules penetrate the membrane as a consequence of the absorbent pad, while the *Legionella* antigen cannot cross the membrane and is progressively concentrated. The centrifugal device combines a low-binding ultrafiltration membrane with a vertical housing. Water and small molecules penetrate the membrane as a consequence of centrifugation, while *Legionella* antigen cannot cross the membrane and is concentrated. Four ml of each nonconcentrated urine sample was centrifuged to  $3,000 \times g$  (MSE Mistral 2000; Sanyo Gallenkamp PLC, Middlesex, United Kingdom) for 15 min. When necessary, additional centrifugation processes of 5 min each were used until the 25-fold concentration was obtained.

Initially, all urine samples were concentrated by passive ultrafiltration, and the *Legionella* antigen was detected by EIA. Then, the urine samples were frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  for 3 to 12 months. Afterwards, the urine samples were thawed and concentrated by centrifugal ultrafiltration, and the antigen was detected by ICT. The ICT results for CU obtained by centrifugal ultrafiltration were compared with the previous result obtained by the EIA for CU obtained by passive ultrafiltration. The EIA and ICT were previously compared, and highly comparable results were obtained (2).

The results obtained by using CU processed by centrifugal ultrafiltration were identical to those obtained by using CU

processed by passive ultrafiltration for the 35 urine samples with a *Legionella* diagnosis. The ratios obtained by the EIA method ranged between 4.49 and 41.9 (mean, 16.53; SD, 9.45). Centrifugal concentration did not represent a decrease in the sensitivity of the antigen detection, including samples with a low antigenic content. All CU samples obtained by centrifugal ultrafiltration from the non-*Legionella* patient specimens were negative by ICT.

The overall agreement between both concentration methods was 100%. The time needed to concentrate urine by passive ultrafiltration was between 1 and 3 h, depending on the physical characteristics of each specimen. Some specimens took over 6 h to reach a concentration of 25-fold. In contrast, the time required in the centrifugal ultrafiltration was only 15 min. A few samples did require an additional 5-min centrifugation step to obtain the desired concentration. In conclusion, centrifugal ultrafiltration is a valid methodology for carrying out *L. pneumophila* antigen concentration without decreasing the ICT test sensitivity or specificity.

#### REFERENCES

1. Domínguez, J. A., J. M. Manterola, R. Blavia, N. Sopena, F. J. Belda, E. Padilla, M. Giménez, M. Sabriá, J. Morera, and V. Ausina. 1996. Detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in nonconcentrated urine and urine concentrated by selective ultrafiltration. *J. Clin. Microbiol.* **34**:2334–2336.
2. Domínguez, J., N. Galí, L. Matas, P. Pedroso, A. Hernández, E. Padilla, and V. Ausina. 1999. Evaluation of a rapid immunochromatographic assay for the detection of *Legionella* antigen in urine samples. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**:896–898.
3. Domínguez, J., N. Galí, S. Blanco, P. Pedroso, C. Prat, L. Matas, and V. Ausina. 2001. Assessment of a new test to detect *Legionella* urinary antigen for the diagnosis of Legionnaire's disease. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **41**:199–203.
4. Doskeland, S., and B. P. Berdal. 1980. Bacterial antigen detection in body fluids: methods for rapid antigen concentration and reduction of nonspecific reactions. *J. Clin. Microbiol.* **11**:380–384.
5. Harrison, T. G., and N. Doshi. 2001. Evaluation of the Bartels *Legionella* Urinary Antigen enzyme immunoassay. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **20**:738–740.
6. Helbig, J. H., S. A. Uldam, P. C. Lück, and T. G. Harrison. 2001. Detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine samples by the BinaxNOW immunochromatographic assay and comparison with both Binax *Legionella* Urinary Enzyme Immunoassay (EIA) and Biotest *Legionella* Urin Antigen EIA. *J. Med. Microbiol.* **50**:509–516.

S. Blanco

C. Prat

M. A. Pallarés

L. Matas

J. Domínguez\*

Servei de Microbiologia

Hospital Universitari Germans Trias i Pujol

Carrerera del Canyet s/n

08916 Badalona, Barcelona, Spain

\*Phone: 34 93 497 88 94

Fax: 34 93 497 88 95

E-mail: jadoming@ns.hugtip.scs.es



# **Artículo 4**





## Severity of *Legionella* pneumonia associated with urinary antigen load

Silvia Blanco<sup>1</sup>, BSc; Cristina Prat<sup>1</sup>, MD, PhD; Felipe Andreo<sup>2</sup>, MD, PhD; Maria Dolores Sánchez<sup>1</sup>, BSc; Núria Galí<sup>1</sup>, BSc; Alicia Lacoma<sup>1</sup>, BSc; Vicente Ausina<sup>1</sup>, MD, PhD; and José Domínguez<sup>1</sup>, PhD.

*Servei de Microbiologia<sup>1</sup> and Servei de Pneumologia<sup>2</sup>, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol. Universitat Autònoma de Barcelona. CIBER Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Badalona, Spain*

**Background:** There is a clinical need for new markers to identify patients at risk of death and poorer outcomes among those with *Legionella* pneumonia. The objective of this study was to evaluate if the *Legionella* urinary antigen load may be associated with outcomes in patients with *Legionella* pneumonia.

**Methods:** An ELISA for urinary *Legionella* antigen load quantification was developed. We studied 48 patients diagnosed of *Legionella* pneumonia by means of immunochromatographic urinary antigen detection test. Serial samples were also collected.

**Results:** Values of antigen concentration in NCU at the time of admission have not shown significant differences relating to in function of patient's clinical characteristics. At the admission moment higher values of antigen load were detected in patients stratified in class V of the pneumonia severity index, and in patients who died, although the differences did not reach statistical significance. However, the decrease between the antigen load at the admission moment and 3 to 6 days after was significantly higher in patients who resolved the pneumonia totally in comparison with patients with worse clinical outcomes and patients who died.

**Conclusion:** *Legionella* urinary antigen load determination at the admission moment and its successive monitoring could be a useful marker of prognosis complementing clinical severity prediction scores to identify patients with high risk of death. Further studies are needed to corroborate these results.

**Correspondence to:** Jose Domínguez. Servei de Microbiologia. Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol. Carretera del Canyet s/n. 08916. Badalona. Barcelona. Spain. Phone: +34934978894; Fax: +34934978895; e-mail: jadomb@gmail.com

Since it was first described in 1977, *Legionella pneumophila* has gradually become a more common cause of both community and hospital-acquired pneumonia. The range and severity of manifestations of this infection have likewise increased (6), and the early symptoms of Legionnaires' disease are indistinguishable from pneumonia caused by other germs (7). Conventional microbiological tests (eg, sputum culture and serology) have limited clinical utility due to both low sensitivity and the delay for results to be available (8).

The detection of *Legionella* antigen in urine samples is the most powerful method for diagnosing legionellosis, and it is therefore important for making therapeutic decisions. The detection of the *Legionella* soluble antigen in urine by enzyme immunoassay (EIA), has proven rapid, sensitive and specific in diagnosing legionellosis, and the use of concentrated urine improves the sensitivity significantly (5). With respect to *Legionella pneumophila* serogroup 1, the assays are reported to have a sensitivity of 80 to 93% for culture-proven cases. (1, 3, 4, 12,

15, 18). The major challenges associated with pneumonia include identifying patients at risk of death. Patients are commonly stratified into risk groups by using scoring systems (pneumonia severity index [PSI](9) or CURB-65(13)). These scoring systems perform correctly when studied in large cohorts, but they should not be used for clinical decisions at an individual level.

Although diagnosis clearly benefits from *Legionella* urinary antigen detection, the relationship between urinary antigen load and clinical outcomes has not been investigated. We have developed a quantitative ELISA using purified antigen of *L. pneumophila* serogroup 1, based on Binax ELISA platform (Binax, Inc. Portland, Maine USA) and we have calculated the concentration of antigen in patients diagnosed of pneumonia caused by *L. pneumophila*. We have studied the correlation between the urinary antigen loads with the severity of the pneumonia, the clinical outcomes.

## MATERIAL AND METHODS

### Patients

We prospectively studied 48 urine samples from 48 patients (40 males and 8 females) with the diagnosis of *Legionella* pneumonia. All patients were diagnosed by detection of soluble antigen from *L. pneumophila* serogroup 1 in non concentrated urine (NCU) by immunochromatographic tests (ICT) (Binax Now™ *Legionella* Urinary Antigen Test; Binax, Portland, Maine). In addition, 29 patients were also diagnosed by serology. The following data were collected: age, sex, underlying diseases, immunosuppression status, radiological extension, PSI, and clinical outcome. Mean age of the patients was 55.5 years and the range 27-83 years. Demographic characteristics are summarized in Table 1.

All patients were diagnosed of pneumonia following radiological and clinical standard criteria. Chest radiography was performed at the time of admission that showed a radiographic pulmonary infiltrate that was at least segmental or present in one lobe, consistent with pneumonia, and not pre-existing. Clinical features were consistent with an acute lower respiratory tract infection including two or more of the following: new or increasing cough, sputum production, pleuritic chest pain, dyspnea, pulmonary consolidation by physical examination; and one or more constitutional symptoms including temperature  $>37.8^{\circ}\text{C}$ , sweating, altered mental status, aches and pain, headaches, coryza, or sore throat. All patients diagnosed of *Legionella* pneumonia were treated at admission with macrolides.

### Inclusion criteria

The inclusion criteria were: (1) patients diagnosed with *Legionella* pneumonia by urinary antigen detection by ICT in NCU, and (2) possibility of follow-up in the hospital's outpatient department and periodical urine collection.

### Clinical outcome definition

Physician assessed the clinical evolution once treatment had finished and during follow-up visits. Clinical assessment was based on the comparison of clinical presentation at the admission. Resolution of pneumonia was defined as disappearance of signs and symptoms of pneumonia: dyspnea, cough, expectoration, fever, resolution of leukocytosis and disappearance of pulmonary infiltrates in the chest radiograph. Improvement was defined as resolution of fever but incomplete resolution of other signs and/or symptoms of pneumonia. Adverse medical outcome was defined as in-hospital death

and/or need for ICU admission. Pneumonia severity and clinical outcome of these patients are also detailed in table 1.

**Table 1. Clinical characteristics of patients with *Legionella* pneumonia included in the study.**

Variables	Nr of patients (%)
>65 years	Yes 15 (31,2)
	No 33 (68,8)
Sex	Male 41 (83,7)
	Female 8 (16,3)
Diabetes	Yes 6 (12,5)
	No 42 (87,5)
Alcohol drinker	Yes 10 (20,8)
	No 37 (77,1)
	Ex 1 (2,1)
Smoker	Yes 28 (58,3)
	No 11 (22,9)
	Ex 9 (18,8)
COPD	Yes 3 (6,2)
	No 45 (93,8)
Immunosuppression	Yes 3 (6,2)
	No 45 (93,8)
Multilobar pneumonia	Yes 11 (22,9)
	No 37 (77,1)
Fine	1 7 (14,6)
	2 16 (33,3)
	3 14 (29,2)
	4 8 (16,7)
	5 3 (6,3)
Clinical outcome	Resolution 39 (81,3)
	Improvement 6 (12,5)
	Death 3 (6,2)

### Sample collection

For each patient with legionellosis, we collected two serial samples, one at the moment of admission and one 3-6 days after. We analyzed 48 NCU samples collected at the moment of admission and 37 NCU samples collected 3-6 days after. In some cases, we were able to collect serial samples between the 11<sup>th</sup> and the 20<sup>th</sup> day (9 patients), on the 30<sup>th</sup> (4 patients) and on the 60<sup>th</sup> (2 patients) day after hospital admission.

### Sample treatment

The samples were boiled for 5 minutes and centrifuged at 1,000g for 15 minutes to prevent nonspecific reactions. This sample treatment protocol is not considered in the manufacturer procedures.

### Binax Now™ *Legionella* Urinary Antigen Test

ICT was performed according to the instructions of the manufacturer. The results were read visually after 15 minutes. The test was interpreted according to the presence or absence of visually detectable pink-to-purple coloured lines. ICT results were blindly read by two independent trained persons.

The test was performed following the manufacturer's instructions.

## Legionella antigen load quantification

To determine *L. pneumophila* antigen load in urine samples we developed a quantitative ELISA using the Binax EIA platform. The ELISA test is a direct sandwich assay that uses polyclonal rabbit immunoglobulin G specific for *L. pneumophila* serogroup 1 as the capture and detection antibody. In every run, a standard curve was established using different purified *L.pneumophila* serogroup 1 antigen concentration (>90% purity, kindly provided by R. Piasio from BINAX). The antigen load in urine samples was quantified by extrapolation of the optical density of the samples in the standard curve.

## Statistical analysis

Data collected was entered into an electronic data base for analysis. Comparison for variables was conducted with the non-parametric Mann-Whitney U test and was described as the mean (standard deviation). Graphical representation is based on non-parametric box-plots, and data are expressed on median and 5-95 percentiles. Comparison in the antigen load at the diagnosis moment and during the monitoring stage was performed by Wilcoxon test. The area under the receiver operating characteristic (ROC) curve was to be an index of discrimination. Associations were considered statistically significant if the *p* value was less than 0.05. Statistical analysis was made using a statistical software package (SPSS, version 15.0 for Windows; SPSS, Inc. Chicago, IL).

## RESULTS

### Quantitative antigen load analysis

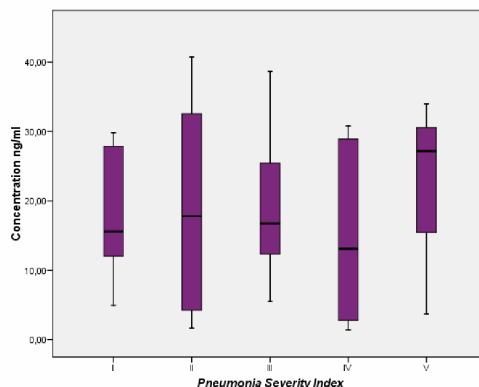
The mean antigen concentration in all patients included was 18.98 ng/ml (SD: 12.9) in NCU samples collected at the moment of admission. For samples collected between 3-6 days after admission, the mean load was 3.76 ng/ml (SD: 7.4). The mean antigen load for samples collected on day 11-20, 30 and 60 after the hospital admission was 5.47 (SD: 7.6), 3.52 (SD: 4.6) and 1.08 (SD: 1.5), respectively.

### Antigen load and clinical outcomes

Values of antigen concentration in NCU at the time of admission have not shown significant differences depending on patient's clinical characteristics. At admission, when we studied the pneumonia severity, we found similar values (figure 2) in Fine I to III patients *versus* Fine IV-V patients. Clinical response hasn't shown significant differences in patients who did not survive *versus* those who recovered fully, but if we

observe the median values we see a tendency to increase in patients who didn't recover. Median *Legionella* antigen concentration at admission was 18,3 ng/ml (SD: 13,2) in cured patients, 17,4 (SD 12,2) in improvement patients and 29,70 (SD: 3,4) in patients who died. The area under the ROC curve was 0,761 (95% CI 0,626-0,897). The best threshold was 26,38 ng/ml with a sensitivity of 100% and 70% of specificity, for detecting patients who died.

**FIGURE 1.** Antigen concentration median and 5-95 percentiles values at admission according to Pneumonia Severity Index.



Antigen concentration shows a tendency to decrease over the days after hospital admission (Table 2). With regard to the severity, although the median showed higher values for the class V of PSI (class I, median: 15.61, 95% confidence interval (CI): 6.96-36.77); class II, median: 17.77, 95%CI: 11.47-26.80; class III, median: 16.76, 95%CI: 13.2-24.66; class IV, median: 13.10, 95%CI: 4.27-26.19; and class V, median 27.19, 95%CI: 17.86-61.10) it did not reach statistical significance (Figure 1)

Similarly, although high antigen load was associated with worse clinical outcomes, the differences were not significant statistically (Table 2). Figure 2, shows median and 5-95 percentiles at the time of admission and 3-6 days after admission of the patients grouped as: resolution, improvement and death. Patients with worse outcome seem to show a tendency for higher concentration of antigen.

### Discrimination assessment: ROC curve analysis

The discriminative ability of bacterial load to assess clinical outcomes in patients with *Legionella* pneumonia was evaluated by ROC curve analysis. The area under the ROC curve was 0.79 (95% CI: 0.65-9.92) for discriminate death. We determined an

optimum bacterial load of 26.56 ng/ml with a sensitivity of 100% and a specificity of 68.9%.

The antigen load decreased after admission. In figure 2 the kinetics that follows the antigen load after the diagnosis of all patients included in the study is shown.

### Kinetics antigen load after diagnosis

The decrease in bacterial load between the admission moment and 3-6 days after, considering all the patients included, was statistically significant ( $p < 0.0001$ ). Considering exclusively the patients with complete resolution of the pneumonia, the antigen load decrease significantly ( $p < 0.001$ ) from  $(18.34 \pm 13.20)$  to  $(2.09 \pm 5.60)$ . However, when we take into account exclusively patients with improvement of pneumonia but not complete resolution the bacterial load did not decrease significantly ( $p = 0.080$ ) from  $(17.35 \pm 12.23)$  to  $(5.92 \pm 6.84)$ . In addition, although the number of patients who died is reduced (only 3) the antigen load at the admission did not decrease significantly in day 3-6. ( $p = 0.180$ ). The three patients who died were admitted to the ICU unit.

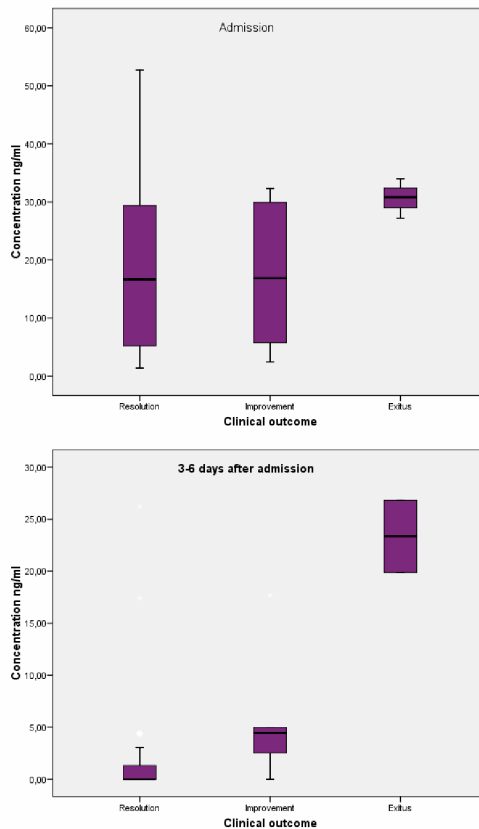
On the other hand, the antigen load was significantly higher in patients who improved compared to those who were cured ( $p = 0.043$ ).

**Table 2. Association between the *Legionella* Urinary antigen load and the clinical characteristics of the patients.**

Variables	Admission			3-6 days after admission	
	Yes	Median (SD)	<i>p</i>	Median (SD)	<i>p</i>
> 65	Yes	15.1 (12.6)	NS	3.1 (7.9)	NS
	No	20.9 (12.7)		3.1 (5.9)	
Diabetes	Yes	17.8 (11.7)	NS	7.4 (10.7)	NS
	No	19.3 (13.1)		2.4 (5.4)	
Alcohol	Yes	21.2 (13.4)	Yes vs no:	3.1 (5.9)	Yes vs no: NS
	No	19 (12.7)	NS	3.1 (6.7)	
Smoker	Yes	21.7 (12.8)	NS	4.7 (7.6)	NS
	No	16.6 (11.6)		0.5 (0.9)	
	Ex	14.6 (13.8)		-	
COPD	Yes	22.1 (6.7)	NS	8.8 (15.2)	NS
	No	18.9 (13.1)		2.6 (5.3)	
Immunosupresion	Yes	25.9 (7.4)	NS	-	NA
	No	18.5 (13.1)		3.1 (6.4)	
Multilobar	Yes	22.4 (14.3)	NS	5.6 (9.2)	NS
	No	18.2 (12.4)		2.5 (5.6)	
Pneumonia	I	21.9 (15.1)		3.4 (6.9)	1 vs 5: NS
Severity	II	19.1 (14.4)	1 vs 5: NS	1.9 (4.8)	1 vs 4: NS
	III	18.9 (9.9)	1 vs 4: NS	1 (1.9)	1 vs 5: NS
Index	IV	15.2 (13.1)	1-3 vs 5: NS	9.3 (10.9)	1-3 vs 4: NS
	V	21.6 (15.8)	1-3 vs 4: NS	26.8 (-)	
Clinical outcome	R	18.3 (13.2)	R vs D: NS	2.1 (5.6)	R vs D: <b>0.008</b>
	I	17.4 (12.2)	R vs I: NS	5.9 (6.8)	R vs I: <b>0.043</b>
	D	30.7 (3.4)	I vs D: NS	23.3 (4.9)	I vs D: NS

R Resolution, I Improvement, D Death, NS, Not significant, NA Not Available

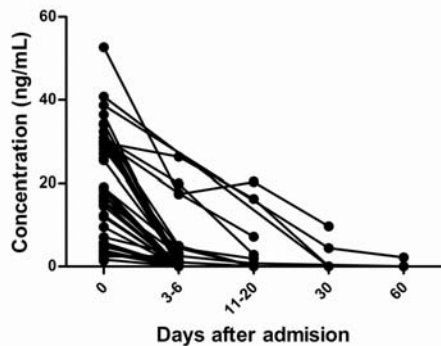
**FIGURE 2. *Legionella* antigen load median and 5-95 percentiles according to the clinical outcome at admission and 3-6 days after admission.**



## DISCUSSION

*Legionella* pneumonia has a substantial mortality and complication rate. Therefore, an early diagnosis and follow-up of the disease are crucial. In addition, markers of severity assessment, other than scoring systems, are required. It has been published several studies about the utility of the *L. pneumophila* antigen detection for legionellosis diagnostic. The usefulness of these techniques is widely recognized but for the moment there are no studies about the correlation between the concentration of antigen and the severity of pneumonia.

In this study we found association between increased *Legionella* urinary antigen load and mortality. Recently, Maurin et al. (14), described that in patients with legionellosis, a high *Legionella* bacterial load in the lower respiratory tract samples at hospital admission was associated with patients classified in the higher PSI classes, the need of hospitalization in ICU and of prolonged



**FIGURE 3.** *Legionella* antigen load kinetics in all patients included in the study after the admission.

hospitalization. Similarly, Rello J et al (17) have described the association between the *Streptococcus pneumoniae* genomic bacterial load on whole-blood samples and severity of pneumococcal pneumonia. In the study, they described that in patients with pneumococcal pneumonia, bacterial load is associated with the likelihood of death, the risk of septic shock, and the need of mechanical ventilation. High genomic bacterial load for *S. pneumoniae* may be a useful tool for severity assessment.

The implication of our findings is that a urine sample obtained for antigen load measurement will provide valuable prognostic information. Our data demonstrate that patients with urinary antigen load over 26,56 ng/ml at the admission moment are an easily and specifically defined high-risk group for death, and in our case of ICU admission. The quantification of bacterial load has the potential to greatly increase our ability to accurately stratify the severity of pneumonia at the admission.

The results obtained with this new quantitative ELISA assay showed a significant association between the kinetics of the antigen load during the hospitalization and the clinical outcomes. Patients with worse clinical outcomes have not reduced significantly the urinary antigen load in comparison with the initial antigen load. In contrast, patients with a favourable evolution have shown a significant decrease in their urinary antigen load 3 to 6 days after the admission.

On the other hand, several studies have shown correlation between levels of inflammation markers and prognosis. In the case of *Legionella* pneumonia, markers that are induced by IFN $\gamma$  are elevated (19), such as neopterin (16). Other classic marker of bacterial infection such as C-reactive protein or the

most recent procalcitonin (PCT), are lower in *Legionella* pneumonia compared with other aetiologies such as pneumococcal pneumonia (16). However, it has been seen that PCT levels have prognostic value, being higher in patients with more severe *Legionella* pneumonia and with adverse medical outcomes (2, 10, 11).

Our study has some limitations. The number of patients included with severe pneumonia, and with worse clinical outcomes (ICU admission and death) is not large, limiting the statistical power. Thus, despite numerical differences in the antigen load at the admission between patients with different severity and clinical outcome, statistical differences were not detected.

In conclusion, it's seems to be a trend of higher *Legionella* urinary antigen load at admission in patients with worse clinical outcome, although significant differences were not found between groups. However, we found differences in the second sample, among patients who improved and died, compared with those in which pneumonia was resolved.

The *Legionella* urinary antigen load determination at the admission moment and their successive monitoring could be a useful marker of prognosis complementing clinical severity prediction scores to identify patients with high risk of death. Further studies are needed to corroborate these results.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank the members of the Spanish Study group for *Legionella* for providing clinical samples. J. Domínguez is a researcher founded for the *Miguel Servet* programme of the *Instituto de Salud Carlos III* (Spain). Binax (Portland, Maine) didn't play a role in the study design, conduct, collection, management, analysis, or interpretation of the data, or preparation, review or approval of the manuscript.

#### REFERENCES

1. Benson, R. F., P. W. Tang, and B. S. Fields. 2000. Evaluation of the Binax and Biotest urinary antigen kits for detection of Legionnaires' disease due to multiple serogroups and species of Legionella. *J Clin Microbiol* **38**:2763-5.
2. de Jager, C. P., N. C. de Wit, G. Weers-Pothoff, T. van der Poll, and P. C. Wever. 2009. Procalcitonin kinetics in *Legionella pneumophila* pneumonia. *Clin Microbiol Infect* **15**:1020-5.
3. Domínguez, J., N. Gali, S. Blanco, P. Pedrosa, C. Prat, L. Matas, and V. Ausina. 2001. Assessment of a new test to

- detect *Legionella* urinary antigen for the diagnosis of Legionnaires' Disease. *Diagn Microbiol Infect Dis* **41**:199-203.
4. **Dominguez, J. A., N. Gali, P. Pedroso, A. Fargas, E. Padilla, J. M. Manterola, and L. Matas.** 1998. 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* **36**:2718-22.
  5. **Dominguez, J. A., J. M. Manterola, R. Blavia, N. Sopena, F. J. Belda, E. Padilla, M. Gimenez, M. Sabria, J. Morera, and V. Ausina.** 1996. Detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in nonconcentrated urine and urine concentrated by selective ultrafiltration. *J Clin Microbiol* **34**:2334-6.
  6. **Edelstein, P. H.** 1987. Laboratory diagnosis of infections caused by legionellae. *Eur J Clin Microbiol* **6**:216.
  7. **Edelstein, P. H.** 1993. Legionnaires' disease. *Clin Infect Dis* **16**:741-7.
  8. **Edelstein, P. H., R. D. Meyer, and S. M. Finegold.** 1980. Laboratory diagnosis of Legionnaires' disease. *Am Rev Respir Dis* **121**:317-27.
  9. **Fine, M. J., T. E. Auble, D. M. Yealy, B. H. Hanusa, L. A. Weissfeld, D. E. Singer, C. M. Coley, T. J. Marrie, and W. N. Kapoor.** 1997. A prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia. *N Engl J Med* **336**:243-50.
  10. **Franzin, L., and D. Cabodi.** 2005. *Legionella* pneumonia and serum procalcitonin. *Curr Microbiol* **50**:43-6.
  11. **Haeuptle, J., R. Zaborsky, R. Fiumefreddo, A. Trampuz, I. Steffen, R. Frei, M. Christ-Crain, B. Muller, and P. Schuetz.** 2009. Prognostic value of procalcitonin in *Legionella* pneumonia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **28**:55-60.
  12. **Kazandjian, D., R. Chiew, and G. L. Gilbert.** 1997. Rapid diagnosis of *Legionella pneumophila* serogroup 1 infection with the Binax enzyme immunoassay urinary antigen test. *J Clin Microbiol* **35**:954-6.
  13. **Lim, W. S., M. M. van der Eerden, R. Laing, W. G. Boersma, N. Karalus, G. I. Town, S. A. Lewis, and J. T. Macfarlane.** 2003. Defining community acquired pneumonia severity on presentation to hospital: an international derivation and validation study. *Thorax* **58**:377-82.
  14. **Maurin, M., L. Hammer, B. Gestin, J. F. Timsit, O. Rogeaux, F. Delavena, J. Tous, O. Epaulard, J. P. Brion, and J. Croize.** Quantitative real-time PCR tests for diagnostic and prognostic purposes in cases of legionellosis. *Clin Microbiol Infect* **16**:379-84.
  15. **Plouffe, J. F., T. M. File, Jr., R. F. Breiman, B. A. Hackman, S. J. Salstrom, B. J. Marston, and B. S. Fields.** 1995. Reevaluation of the definition of Legionnaires' disease: use of the urinary antigen assay. Community Based Pneumonia Incidence Study Group. *Clin Infect Dis* **20**:1286-91.
  16. **Prat, C., J. Dominguez, F. Andreo, S. Blanco, A. Pallares, F. Cuchillo, C. Ramil, J. Ruiz-Manzano, and V. Ausina.** 2006. Procalcitonin and neopterin correlation with aetiology and severity of pneumonia. *J Infect* **52**:169-77.
  17. **Rello, J., T. Lisboa, M. Lujan, M. Gallego, C. Kee, I. Kay, D. Lopez, and G. W. Waterer.** 2009. Severity of pneumococcal pneumonia associated with genomic bacterial load. *Chest* **136**:832-40.
  18. **Ruf, B., D. Schurmann, I. Horbach, F. J. Fehrenbach, and H. D. Pohle.** 1990. Prevalence and diagnosis of *Legionella* pneumonia: a 3-year prospective study with emphasis on application of urinary antigen detection. *J Infect Dis* **162**:1341-8.
  19. **Weiss, G., C. Murr, H. Zoller, M. Haun, B. Widner, C. Ludescher, and D. Fuchs.** 1999. Modulation of neopterin formation and tryptophan degradation by Th1- and Th2-derived cytokines in human monocytic cells. *Clin Exp Immunol* **116**:435-40.

# **Artículo 5**







ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

Int. J. Hyg. Environ. Health 211 (2008) 168–171

International Journal  
of Hygiene and  
Environmental Health

[www.elsevier.de/ijheh](http://www.elsevier.de/ijheh)

## Evaluation of a *Legionella* urinary antigen enzyme immunoassay for rapid detection of *Legionella pneumophila* in water samples<sup>☆</sup>

S. Blanco<sup>a</sup>, C. Prat<sup>a</sup>, M.D. Sánchez<sup>a</sup>, D. Ferrer<sup>b</sup>, T. Pellicer<sup>b</sup>, L. Haba<sup>a</sup>, I. Latorre<sup>a</sup>, C. Vilaplana<sup>a</sup>, V. Ausina<sup>a</sup>, J. Domínguez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Servei de Microbiologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Carretera del Canyet s/n, 08916 Badalona, Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>b</sup>Laboratori de l'Agència de Salut Pública de Barcelona, Spain

Received 23 March 2006; received in revised form 12 December 2006; accepted 12 February 2007

### Abstract

Despite advances in medium formulations and pretreatment techniques, recovery of *Legionella* from water samples can still be quite low, difficult and time consuming. The aim of this study was to evaluate the utility of a *Legionella* urinary antigen enzyme immunoassay (Bartels ELISA, Trinity Biotech, Ireland) for the detection of *Legionella* in water samples. Reference ATCC *Legionella* strains were used to spike water samples to a final concentration of  $10^4$ – $10^5$  cfu/ml. The lower detection limit of the test for all *Legionella pneumophila* serogroups was assessed by serial dilutions of spiked water samples. *Legionella* antigen was detected in all filtered samples except for those spiked with *L. bozemanii* and *L. longbeachae*. The lower detection limit for soluble *L. pneumophila* serogroup 1 antigen was 780 cfu/ml. Bartels ELISA could be a useful method for antigen detection in water samples when a high recovery of *L. pneumophila* is suspected. The test could be used as a rapid screening method for the detection of *Legionella* in a large number of samples. However, the low sensitivity of the test requires to keep on performing conventional culture for isolation and for further studies on isolated bacteria.

© 2007 Elsevier GmbH. All rights reserved.

**Keywords:** *Legionella* antigen; Bartels ELISA; Water samples

### Introduction

*Legionella pneumophila* is a recognized pathogen causing both community-acquired and nosocomial pneumonia (Bartlett et al., 2000; Mandell, 2000; Ruef,

1998; Stout and Yu, 1997). Water is the major reservoir for *Legionella*, and although these bacteria are found in freshwater environments worldwide, legionellosis disease has emerged because of human alteration of the environment (Fields et al., 2002). Water systems in buildings are often contaminated with *Legionella* and therefore serve as amplifiers of the bacteria, representing a source of outbreaks and sporadic infection. Hospitals represent ideal locations for legionnaires' disease transmission: at-risk patients, plumbing systems are frequently old and water temperatures are often reduced to prevent scalding of patients. Over the last years, several

<sup>☆</sup>Part of this study was presented at the 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases held in Praha in May 2004.

\*Corresponding author. Tel.: +34934978894;

fax: +34934978895.

E-mail address: [jadominguez.itgp.germanstrias@gencat.net](mailto:jadominguez.itgp.germanstrias@gencat.net) (J. Domínguez).

large outbreaks linked to cooling towers and other water systems have been described (Fields et al., 2002).

The control of colonization in cooling towers and other aerosol-generating devices can reduce community outbreaks of legionnaires' disease (Fields et al., 2002). In addition, the control of hot water system colonization in hospitals is crucial to prevent *Legionella* infection in patients at-risk (Ruef, 1998). Despite advances in medium formulations and pretreatment techniques, recovery of *Legionella* from water samples can still be quite low, difficult and time consuming (Edelstein, 1987). In addition, although there is an international consensus guideline for culture detection and enumeration of *Legionella* in water (International Organization for Standardization, 1998), the overgrowth of other accompanying bacteria and the presence of viable but non-culturable *Legionella* have not been fully resolved (Steiner et al., 1997). Thus, there is a need for improved detection methods. Urinary antigen testing has been proven rapid, sensitive and specific in diagnosing legionellosis (Domínguez et al., 1996, 1998, 2001; Helbig et al., 2001, 2003).

The aim of this study was to evaluate the utility of a *Legionella* urinary antigen enzyme immunoassay (Bartels ELISA *Legionella* urinary antigen, Trinity Biotech plc, Co. Wicklow, Ireland) for the detection of *Legionella* in water samples, comparing the results with conventional bacterial culture.

## Material and methods

### Water samples

#### Samples A

The following ATCC strains were used to spike water samples to a final concentration of  $10^4$ – $10^5$  *Legionella*/ml: *L. pneumophila* serogroup 1 Philadelphia 1 (ATCC 33152), *L. pneumophila* serogroup 2 Togus 1 (ATCC 33154), *L. pneumophila* serogroup 3 Bloomington 2 (ATCC 33155), *L. pneumophila* serogroup 4 Los Angeles 1 (ATCC 33156), *L. pneumophila* serogroup 5 Dallas 1 (ATCC 33216), *L. pneumophila* serogroup 6 Chicago 2 (ATCC 33215), *L. pneumophila* serogroup 7 Chicago 8 (ATCC 33823), *L. pneumophila* serogroup 8 Concord 3 (ATCC 35096), *L. pneumophila* serogroup 9 IN-23-GI-C2 (ATCC 35298), *L. pneumophila* serogroup 10 Leiden 1 (ATCC 43283), *L. pneumophila* serogroup 11 797-PA-H (ATCC 43130), *L. pneumophila* serogroup 12 570-CO-H (ATCC 43290), *L. pneumophila* serogroup 13 82A3105 (ATCC 43736), *L. pneumophila* serogroup 14 1169-MN-H (ATCC 43703), *Legionella bozemanii* serogroup 1 WIGA (ATCC 33217) and *Legionella longbeachae* serogroup 1 Long Beach 4 (ATCC 33462).

In addition, 9 wildtype *L. pneumophila* serogroup 1 strains were also used to spike water samples.

The lower detection limit of the test for all *L. pneumophila* serogroups was assessed by serial dilution of spiked water samples from  $10^5$  to 100 cfu/ml. The simulated samples were performed using sterile distilled water.

#### Samples B

In addition to the spiked water samples, 68 water system samples collected from different sources for *Legionella* screening were tested: 13 from domestic water systems (2 with negative culture, 5 *L. pneumophila* serogroup 1, 1 *L. pneumophila* serogroups 2–14 and 5 with *Legionella* non-pneumophila) and 55 from cooling towers (39 with negative culture, 9 *L. pneumophila* serogroup 1, and 7 *L. pneumophila* serogroups 2–14).

### Sample treatment for antigen detection

One liter of all water samples was filtered over 0.2  $\mu$ m pore size Millipore membrane filters (Pumphead Millipore, Barrington, USA). Each filter was placed into a test tube containing 1 ml of distilled water. Afterwards, all samples were sonicated for 2 min (Branson 1 200, Branson<sup>®</sup> Ultrasonic Corporation, CT, USA).

### Culture and identification

Samples A were cultured directly after filtering. All water system samples (samples B) were cultured on selective BCYE agar after heating and acid treatment (Edelstein, 1987; International Organization for Standardization, 1998). Identification of the isolates was performed following standard procedures (Edelstein, 1987).

### ELISA test procedure

The Bartels assay is a direct sandwich assay that uses polyclonal rabbit antibodies which react with *L. pneumophila* serogroup 1 antigen both as capture and detection antibodies. Following the manufacturer's instructions, the test was performed with samples of 100  $\mu$ l. Samples were considered positive when their optical density was 4 times higher than that of the negative control. In all cases antigen detection was performed in water samples before and after sonication.

## Results and discussion

In our study in spiked water samples, Bartels ELISA was able to detect the antigen from all serogroups of *L. pneumophila* tested, although it showed a higher sensitivity for *L. pneumophila* serogroup 1 (Table 1). The detection limit for the serogroup 1 was about

**Table 1.** Bartels ELISA results for water samples spiked with *Legionella* ATCC strains (samples A)

<i>Legionella</i> strain	Original sample	Filtered sample		Filtered and sonicated sample Ratio EIA
	Bacterial load (cfu/ml)	Ratio EIA	Bacterial load (cfu/ml)	
<i>L. pneumophila</i> s. 1	$5 \times 10^5$	Overflow	$1.1 \times 10^8$	Overflow
<i>L. pneumophila</i> s. 2	$1 \times 10^5$	12	$1.1 \times 10^7$	12
<i>L. pneumophila</i> s. 3	$2 \times 10^4$	4.7	$7.5 \times 10^6$	4.9
<i>L. pneumophila</i> s. 4	$5.3 \times 10^5$	8.5	$1.3 \times 10^8$	8.9
<i>L. pneumophila</i> s. 5	$1 \times 10^5$	8.2	$4.8 \times 10^7$	7.4
<i>L. pneumophila</i> s. 6	$2 \times 10^5$	15	$5.1 \times 10^7$	12
<i>L. pneumophila</i> s. 7	$1 \times 10^5$	11	$3 \times 10^7$	9
<i>L. pneumophila</i> s. 8	$2 \times 10^5$	7.5	$6 \times 10^7$	8.5
<i>L. pneumophila</i> s. 9	$6 \times 10^4$	14.5	$7.5 \times 10^6$	5.4
<i>L. pneumophila</i> s. 10	$1.5 \times 10^6$	4.14	$6 \times 10^8$	4.14
<i>L. pneumophila</i> s. 11	$1 \times 10^5$	9.7	$9 \times 10^6$	9.2
<i>L. pneumophila</i> s. 12	$3 \times 10^5$	7.1	$6 \times 10^7$	7
<i>L. pneumophila</i> s. 13	$4 \times 10^5$	6.8	$1.8 \times 10^8$	6.8
<i>L. pneumophila</i> s. 14	$9 \times 10^5$	7.2	$2.5 \times 10^8$	7.7
<i>L. bozemanii</i>	$1 \times 10^5$	Negative	$9 \times 10^7$	Negative
<i>L. longbeachae</i>	$3 \times 10^5$	Negative	$3 \times 10^7$	Negative

780 cfu/ml in the original water sample. On the other hand, the test did not detect *L. bozemanii* nor *L. longbeachae* antigen. Sonication of spiked water samples did not increase the sensitivity of the technique.

Other immunoassays have also been assessed. Lück and Liebscher (2003) evaluated a *L. pneumophila* antigen detection assay (Binax Equate™, ME, USA) designed for qualitative determination of *Legionella* in potable water samples. In *in vitro* experiments, they found a detection limit of 1000 cfu/ml for *L. pneumophila* serogroup 1 strain Corby. However, the test was unable to detect *L. pneumophila* serogroups 2–14. On the other hand, Horn (J. Horn Abstr. 11th Eur. Cong. Clin. Microbiol. Infect. Dis., abstr. P997, 2001) evaluated the utility of the Biotest urinary antigen test in detecting *Legionella* in water samples. They reported that the Biotest EIA is able to detect *Legionella* antigen from all serogroups of *L. pneumophila* and other species of *Legionella* in simulated samples. Horn claimed that the detection limit for *L. pneumophila* serogroups 1 and 5 was around 10 cfu/ml. In contrast, Helbig et al. (2001) using a similar procedure reported a detection limit for the Biotest EIA of  $3 \times 10^4$  cfu/ml when a *L. pneumophila* serogroup 1 Philadelphia was used, and  $6 \times 10^5$  cfu/ml when the OLDA strain was used. As an alternative to immunological methods, polymerase chain reaction (PCR) assays have been developed. Levi et al. (2003) evaluated 120 water samples using a real-time PCR hybridization assay for *L. pneumophila* and obtained a detection limit equivalent to 800 cfu/ml. Using the Bartels ELISA we obtained a similar detection limit, while not requiring such expensive and specialized equipment.

From the tap water samples, Bartels ELISA was positive in 8 cooling tower water samples. In 7 cases the culture for *Legionella* was negative, these may be considered as false-positive results. However, due to contamination of culture plates with other bacteria, we could not rule out the possibility that these 7 samples were actually true positives. In the only positive Bartels ELISA the concentration of *L. pneumophila* serogroup 1 was 220 cfu/ml, lower than the minimum necessary for antigen detection in spiked samples. Such findings have also been described by other authors (Lück and Liebscher, 2003). Positive results when the concentration of *Legionella* is under the detection limit of the test could be due to the presence of non-viable *Legionella* and/or presence of free *Legionella* antigen (Steiner et al., 1997). This finding could suggest a build up of antigen in the cooling tower environment. Cross-reactivity with other bacteria is also possible, although in previous studies the Bartels ELISA showed high specificity (Domínguez et al., 2001; Harrison and Doshi, 2001).

Of the 27 samples positive by culture, but negative by Bartels ELISA, *L. pneumophila* serogroup 1 was isolated in 13 cases with a *Legionella* concentration of less than 100 cfu/ml; *L. pneumophila* serogroup 2–14 was isolated in 8 cases (7 samples >100 cfu/ml) and *Legionella* non-*pneumophila* was isolated in 5 cases (all >10 cfu/ml). All negative results by Bartels ELISA were obtained in samples where the concentration of *L. pneumophila* was under the specific limit of detection of the test (Table 1). The detection limit for *L. pneumophila* serogroup 2–14 was lower than for serogroup 1. Therefore, its utility for testing water samples that do not contain serogroup 1 is limited.

Given that the level of water colonization that implies a risk for legionellosis is not well established, the detection limit obtained with the Bartels ELISA does not seem to be low enough to be used for bacteriological surveillance of water systems. However, given that outbreaks of legionnaires' disease have been linked to exposure to amplified levels of *Legionella* organism (Shelton et al., 1993) and that during an outbreak a rapid identification and decontamination of colonized water systems is very important, the Bartels ELISA could be a useful and rapid screening method for large numbers of samples. However, the low sensitivity of the test requires conventional culture for isolation and for further studies on isolated bacteria.

## Acknowledgments

We thank Carmen Pelaz from Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain, for providing *Legionella* ATCC strains.

## References

- Bartlett, J.G., Dowell, S.F., Mandell, L.A., File, T.M., Musher, D.M., Fine, M.J., 2000. Practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin. Infect. Dis.* 31, 347–382.
- Domínguez, J., Manterola, J.M., Blavia, R., Sopena, N., Belda, F.J., Padilla, E., Giménez, M., Sabrià, M., Morera, J., Ausina, V., 1996. Detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in nonconcentrated urine and urine concentrated by selective ultrafiltration. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2334–2336.
- Dominguez, J., Galí, N., Pedroso, P., Fargas, A., Padilla, E., Manterola, J.M., Matas, L., 1998. 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.* 36, 2718–2722.
- Dominguez, J., Galí, N., Blanco, S., Pedroso, P., Prat, C., Matas, L., Ausina, V., 2001. Assessment of a new test to detect *Legionella* urinary antigen for the diagnosis of Legionnaire's Disease. *Diag. Microsc. Infect. Dis.* 41, 199–203.
- Edelstein, P.H., 1987. Laboratory diagnosis of infections caused by *Legionellae*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 6, 4–10.
- Fields, B.S., Benson, R.F., Besser, R.E., 2002. *Legionella* and Legionnaires' Disease: 25 years of investigation. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 506–526.
- Harrison, T.G., Doshi, N., 2001. Evaluation of the Bartels *Legionella* urinary antigen enzyme immunoassay. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20, 738–740.
- Helbig, J.H., Uldum, S.A., Lück, P., Harrison, T.G., 2001. Detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine samples by the BinaxNOW immunochromatographic assay and comparison with both Binax *Legionella* urinary enzyme immunoassay (EIA) and Biotest *Legionella* urin antigen EIA. *J. Med. Microbiol.* 50, 509–516.
- Helbig, J.H., Uldum, S.A., Bernander, S., Lück, P.C., Wewalka, G., Abraham, B., Gaia, V., Harrison, T.G., 2003. Clinical utility of urinary antigen detection for diagnosis of community-acquired, travel-associated, and nosocomial legionnaires' disease. *J. Clin. Microbiol.* 41, 838–840.
- International Organization for Standardization, 1998. ISO 11731:1998 water quality, Detection and enumeration of *Legionella*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Levi, K., Smedley, J., Towner, K.J., 2003. Evaluation of a real-time PCR hybridization assay for rapid detection of *Legionella pneumophila* in hospital and environmental water samples. *Clin. Microbiol. Infect.* 9, 754–758.
- Lück, P.C., Liebscher, B., 2003. Detection of *Legionella pneumophila* in water samples by quantitative culture and an antigen detection assay. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206, 201–204.
- Mandell, L.A., Marrie, T.J., Grossman, R.F., Chow, A.W., Hyland, R.H., 2000. Canadian guidelines for the initial management of community-acquired pneumonia: an evidence-based update by the Canadian Infectious Diseases Society and the Canadian Thoracic Society. *Clin. Infect. Dis.* 31, 383–421.
- Ruef, C., 1998. Nosocomial Legionnaires' disease – strategies for prevention. *J. Microbiol. Methods* 33, 81–91.
- Shelton, B.G., Morris, G.K., Gorman, G.W., 1993. Reducing risks associated with *Legionella* bacteria in building water systems. In: Barbaree, J.M., Breiman, R.F., Dufour, A.P. (Eds.), *Legionella: Current Status and Emerging Perspectives*. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 279–281.
- Steiner, M., Emody, L., Amann, R., Hacker, J., 1997. Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2047–2053.
- Stout, J.E., Yu, V.L., 1997. Legionellosis. *N. Engl. J. Med.* 337, 682–687.

# **Artículo 6**



## Identification of *Legionella* spp. by 19 European reference laboratories: results of the European Working Group for Legionella Infections External Quality Assessment Scheme using DNA sequencing of the macrophage infectivity potentiator gene and dedicated online tools

N. K. Fry<sup>1</sup>, B. Afshar<sup>1</sup>, W. Bellamy<sup>1,2</sup>, A. P. Underwood<sup>2</sup>, R. M. Ratcliff<sup>3</sup>, T. G. Harrison<sup>1</sup> and members of the European Working Group for Legionella Infections\*

<sup>1</sup>Respiratory and Systemic Infection Laboratory, <sup>2</sup>Statistics, Modelling and Bioinformatics Department, Health Protection Agency Centre for Infections, London, UK and <sup>3</sup>Infectious Diseases Laboratories, Institute of Medical and Veterinary Science, Adelaide, Australia

### ABSTRACT

Identification of *Legionella* spp. can be achieved by DNA sequencing of the macrophage infectivity potentiator (*mip*) gene. The External Quality Assurance (EQA) scheme described in this report is the first to assess the proficiency of laboratories using this methodology. The results obtained from two EQA distributions sent to European reference laboratories involved in *Legionella* outbreak control and environmental monitoring are presented. Each distribution contained a panel of ten coded *Legionella* strains. All strains were from clinical and environmental sources and were considered to be wild-type strains. Participants used dedicated online tools to compare sequence text files against a database of known *Legionella* spp. The majority of centres (seven of ten, and 11 of 12) correctly identified all strains tested, in the first and second distributions, respectively. Typically, sequence similarity values of 98–100% were obtained when the test strains were compared with sequences contained in the database. In all but one case, lower values indicated a poor quality sequence. The exception was associated with the identification of a putative new species in the first panel. Genotypic identification of *Legionella* can be achieved by the use of standard protocols, dedicated identification libraries, and online tools. EQA schemes provide an independent measure of performance, and it is recommended that laboratories performing these techniques participate in such schemes, thereby allowing optimisation of and improvements in their performance.

**Keywords** DNA sequencing, external quality assessment, identification, *Legionella* spp., macrophage infectivity potentiator, online tools

**Original Submission:** 21 March 2007; **Revised Submission:** 24 May 2007; **Accepted:** 17 June 2007

*Clin Microbiol Infect* 2007; **13**: 1119–1124

Corresponding author and reprint requests: N. K. Fry, Respiratory and Systemic Infection Laboratory, Health Protection Agency Centre for Infections, 61 Colindale Avenue, London NW9 5EQ, UK

E-mail: Norman.Fry@HPA.org.uk

\*Members of the European Working Group for Legionella Infections who participated in this study were as follows: J. Bangsberg, S. Blanco, J. Etienne, F. Fendukly, L. Franzin, V. Gaia, B. Herrmann, D. Lindsay, P. C. Lück, N. Maes, T. Marques, A. Papoutsis, C. Pelaz Antolín, M. Scaturro, A. van der Zee, P. Visca and G. Wewalka.

### INTRODUCTION

To date, 53 species of *Legionella* have been described [1–3], including one genomospecies [4] and one *Candidatus* species [2]. Approximately one-third of these have been associated with human disease following isolation of the organism from clinically significant infections [1]. The identification of the majority of these species using classical phenotypic methods is very difficult. Several

genotypic methods have been described, including analysis of total genomic DNA (e.g., ribotyping and random amplified polymorphic DNA analysis [5,6]), analysis of specific genes (e.g., rRNA [7], macrophage infectivity potentiator (*mip*) [8], RNA polymerase (*rpoB*) [9], RNase P RNA (*rnpB*) [10] and *gyrA* [11] genes), and analysis of internal regions of these genes (e.g., intergenic regions of rDNA [12] or regions coding for tRNA [13]).

Of these various approaches, PCR amplification and sequencing of the *mip* gene [8] appears to be the best method, for three main reasons. First, the *mip* sequence has more informative sites, both in length and percentage of available bases, than some of the other genes listed above, e.g., 16S rDNA [14]. Second, the procedure is easy to perform, involving only a simple primary PCR and a single sequencing reaction. Third, a comprehensive, dedicated and freely accessible web database has been established by members of the European Working Group for Legionella Infections (EWGLI). This contains sequence data from all validly described species, and many others awaiting formal description, and allows the on-line identification of putative *Legionella* spp.

The aim of the External Quality Assessment (EQA) scheme, devised by EWGLI members at the Health Protection Agency Centre for Infections (HPA CfI), London, UK, was to investigate the ability of European microbiology reference laboratories to identify coded panels of *Legionella*, using a standard protocol and dedicated online tools. This report presents the results from the first two EQA distributions.

## MATERIALS AND METHODS

### Participants

Participation was open to any EWGLI collaborating laboratory. Overall, 19 institutions from 14 countries took part in one or both distributions. Each of these centres acts as a local or national reference laboratory for *Legionella* infections. The study was coordinated on behalf of EWGLI by the HPA CfI. The participating laboratories were: Austrian Agency for Health and Food Safety, Institute of Medical Microbiology and Hygiene, Vienna, Austria; Laboratoire de Référence *Legionella*, Université Libre de Bruxelles-Hôpital Erasme, Brussels, Belgium; Herlev Hospital, Herlev, Denmark; Centre National de Référence des Légionelles, Lyon, France; Technical University Dresden, Dresden, Germany; Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece; Institute for Infectious Diseases, IRCCS Lazzaro Spallanzani, Rome, Italy; Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy; Amedeo di Savoia Hospital, Turin, Italy; St Elisabeth Hospital, Tilburg, The Netherlands; Hospital de Santa Cruz, Carnaxide, Portugal; Scottish *Legio-*

*nella* Reference Laboratory, Glasgow, Scotland; Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden; University Hospital, Uppsala, Sweden; Istituto Cantonale di Microbiologia, Bellinzona, Switzerland; and HPA CfI.

### Study design

The study was designed in two phases. First, a panel of ten strains (see below) was distributed to participants (Distribution 1). Following analysis of the results submitted, and reports back to participants, the procedures were reviewed, and training needs were identified. Following the provision of necessary training, a second panel was distributed (Distribution 2) and the participants' ability was reassessed. Oligonucleotides for PCR amplification and DNA sequencing were not provided by the coordinating centre, but participants were asked to provide information concerning the sequencing platform used.

### Preparation of proficiency panels

Both proficiency panels contained ten coded *Legionella* strains: Panel 1, strains A–J, and Panel 2, strains K–T (Table 1); three strains were included in both panels. With one exception, the strains had been fully characterised previously by phenotypic, serological and genotypic methods. The exception was the strain coded G, which had only been characterised before its inclusion in the panel as being serologically closest to *Legionella moravica*. According to *mip* gene sequencing, this strain also showed the highest similarity to *L. moravica*, but at a much lower level than the other strains (Table 1). All isolates are held in the Respiratory and Systemic Infection Laboratory (RSIL; HPA CfI) or EWGLI culture collections, and are considered to be wild-type strains (i.e., low-passage non-reference strains).

**Table 1.** Strains of *Legionella*, representing 11 species, used in the proficiency panels

<i>Legionella</i> species	Strain identifier <sup>a</sup>	Source <sup>b</sup>	Study code identifier	Sequence similarity (%) to <i>mip</i> profile on database <sup>c</sup>
<i>L. anisa</i>	LC3967	E	A	100
<i>L. bozemanii</i>	LC2915	C	B	100
<i>L. dumoffi</i>	LC5207	E	C/N	100
<i>L. jameslovamiensis</i>	LC5389	E	D/R	100
<i>L. jordanis</i>	LC5073	E	E	99.1
<i>L. longbeachae</i>	LC4987	C	F	100
<i>Legionella</i> sp. <sup>d</sup>	LC5212	E	G	94.6
<i>L. pneumophila</i>	LC6635	C	H	100
<i>L. pneumophila</i>	LC5390	E	I	100
<i>L. quiniconii</i>	LC5068	E	J/T	100
<i>L. saintelensis</i>	LC4348	C	K	100
<i>L. bozemanii</i>	LC4790	C	L	100
<i>L. longbeachae</i>	LC4790	C	L	100
<i>L. jordanis</i>	LC3940	E	M	100
<i>L. bozemanii</i>	LC4348	C	O	100
<i>L. pneumophila</i>	H034700617	C	P	99.6
<i>L. oakridgensis</i>	LC 3780	E	Q	100
<i>L. pneumophila</i>	EUL 137	E	S	100

<sup>a</sup>Strains are held in the Respiratory and Systemic Infection Laboratory, Health Protection Agency Centre for Infections, London, UK (LC and H0 prefix) or European Working Group for Legionella Infections culture collection (EUL prefix).  
<sup>b</sup>C, clinical isolate, E, environmental isolate.

<sup>c</sup>Results from forward and reverse sequencing reactions (or forward on more than one occasion) were determined by the coordinating laboratory before despatch.

<sup>d</sup>This strain was initially characterised as closest serologically, and by *mip* gene sequencing, to *L. moravica*, but was subsequently shown to be a new species of *Legionella*.



Replicates of each strain were prepared on buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar (Oxoid, Basingstoke, UK) slopes, and were then distributed to participants by courier. Panel 1 was dispatched on 13 August 2003 and Panel 2 was dispatched on 8 October 2004.

### Specimen processing

Upon receipt, each centre subcultured the coded strains on BCYE plates according to standard methods [15]. Failure to recover a strain was scored as 'no growth', and these results were excluded from the final analysis. Each centre performed genomic DNA extraction according to their current methodology. The method of Ratcliff *et al.* [8] was used for species identification. Primary amplification was performed using the primers Legmip\_f 5'-GGG(A/G)ATT(A/C/G)TTATG-AAGATGA(A/G)A(C/T)TGG and Legmip\_r 5'-TC(A/G)T-T(A/T/C/G)GG(A/T/G)CC(A/T/G)AT(A/T/C/G)GG(A/T/C/G)CC(ATG)CC. DNA sequencing was performed using the primer Legmip\_fs 5'-TTTATGAAGATGA(A/G)A(C/T)TGGT-C(A/G)CTGC according to local practice. The resulting DNA sequence was entered into the database ([http://www.hpa-bioinfotools.org.uk/mip\\_ID.html](http://www.hpa-bioinfotools.org.uk/mip_ID.html)) as a flat text file in order to allow identification using the similarity tool. The species revealed by the similarity tool as showing the highest percentage similarity to the sequence obtained was taken to be the species identification. The species and similarity (%) were reported for each strain tested.

### Scoring

The performance of each centre was measured in two ways. The first measure was the ability to correctly identify the coded isolates against the coordinating laboratory's intended identification (intended result). For the purpose of these distributions, identifications based on sequence similarity values of  $\leq 80\%$  were considered to be unacceptable and were scored as 'not identified'. Second, laboratories were scored according to the confidence in the identification made, i.e., identification was considered to be 'confident' or 'tentative'. For a confident identification, the *mip* sequence submitted had to show  $\geq 98.0\%$  similarity to a sequence in the database, while submissions of 80–98% similarity were scored as tentative. A combined score of 'tentative' plus 'confident', where the correct species identification was obtained, was also calculated. Results for Panel 1 were only scored for nine strains, as strain G was excluded from the analysis.

### Software

Access to the *Legionella mip* gene sequence database is via the EWGLI website (<http://www.ewgli.org/>) or the HPA bioinformatics webpages (<http://www.hpa.org.uk/cfi/bioinformatics/ewgli/legionellamips.htm>). Details of 157 *Legionella* strains provided by one of the authors (RMR) [16] are stored in a PostgreSQL database. The associated *mip* sequences are stored both in this database and in a local Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [17] database. Software was written to provide a web-based graphical interface to this database, predominantly using perl-cgi and BioPerl Modules [18]. Upon submission of a text sequence to the form on the web page, the sequence is used as a query in a blastn search against the *mip* sequence BLAST database. The full sequences

of the top five database matches are retrieved and aligned with the sequence submitted by the user and a set of *mip* reference sequences selected to cover the entire range of the *Legionella* genus. The alignment is performed using the MAFFT algorithm [19]. Using this procedure, the online tool and underlying database provide the following functions: (i) an alignment of all the sequences from the reference alignment, top five database matches and the user sequence; (ii) a neighbour-joining tree of the alignment, including the reference species, five closest matches from the database and the user sequence; and (iii) an alignment of the eight sequences from the combined alignment that are most similar to the user sequence, together with their percentage similarity scores.

## RESULTS

### Distribution 1

The first panel was distributed to 16 centres in nine countries. Results were returned by ten centres before the deadline (Table 2). Four centres did not recover isolate J successfully, and not all centres reported results for all isolates. Strain G was found by all ten laboratories to have  $< 98\%$  similarity to any sequence in the database, although it showed most similarity (*c.* 95%) to *L. moravica*. Seven of the ten centres identified correctly all strains tested. Two centres misidentified one strain, and one centre misidentified (or failed to identify) five of the seven strains examined. All of the identifications were 'confident' identifications in seven of the laboratories; results from the other centres were mainly 'tentative' or  $< 80\%$ , suggesting that the quality of the *mip* sequences was poor. Following analysis and feedback to the participants, training needs were highlighted and the coordinating centre provided training to three centres before distribution of the second panel.

In the case of the *Legionella jordanis* strain, the coordinating centre determined 560 nucleotides of the *mip* gene before dispatch of the distribution, which showed a maximum similarity value of 99.1% (555/560 nucleotides) to the reference sequence in the database, i.e., five nucleotide differences. Most of these differences were located at the 3'-end of the sequence; thus, the most likely explanation for participants scoring above this value was the submission of shorter sequences, i.e.,  $< 560$  nucleotides.

### Distribution 2

The second panel was distributed to 19 centres in 11 countries. Valid results were returned by 12

**Table 2.** Results obtained with the first *Legionella* distribution<sup>a</sup>

Study code no.	Intended result	Species	Centre no.													No. achieving correct species identification
			2	4	6	9	11	13	16	19	20	15				
A	<i>L. anisa</i>		✓	94.0	✓	<i>L. dumoffii</i> (99.8)	✓	✓	✓	✓	92.6	Not identified (<80)	8/10			
B	<i>L. bozemanii</i>		✓	92.1	✓	✓	NT	✓	✓	✓	97.8	Not identified (<80)	8/9			
C	<i>L. dumoffii</i>		✓	<i>L. anisa</i> (94.0)	✓	99.6	NT	✓	✓	✓	98.0	<i>L. bozemanii</i> (99.8)	7/9			
D	<i>L. jamestowniensis</i>		99.8	83.0	✓	99.7	NT	99.8	✓	✓	NT	<i>L. dumoffii</i> (100)	7/8			
E	<i>L. jordanis</i>		✓	94.6	98.0	✓	99.5	✓	✓	✓	97.7	98.8	10/10			
F	<i>L. longbeachae</i>		✓	98.4	✓	98.7	✓	✓	✓	✓	98.3	<i>L. jordanis</i> (96.7)	9/10			
G <sup>b</sup>	' <i>L. moravica</i> '		94.6	82.9	94.6	94.6	96.0	94.4	94.5	94.6	95.7	96.0	NA			
H	<i>L. pneumophila</i>		99.6	94.9	98.8	✓	99.8	✓	✓	✓	97.4	<i>L. birninghamensis</i> (92.3)	9/10			
I	<i>L. quinlivanii</i>		✓	88.9	✓	✓	NT	99.5	99.5	✓	NT	<i>L. pneumophila</i> (97.6)	7/8			
J	<i>L. saintthelensis</i>		✓	NG	98.2	✓	NT	✓	NG	NG	97.1	NG	5/5			
Centre score	Intended identification	Tentative	0/9	6/8	0/9	0/9	0/4	0/9	0/8	0/8	5/7	0/8				
		Confident	9/9	1/8	9/9	8/9	4/4	9/9	8/8	8/8	2/7	1/8				
		Combined score	9/9	7/8	9/9	8/9	4/4	9/9	8/8	8/8	7/7	1/8				

NT, not tested; NA, not applicable; NG, no growth.

<sup>a</sup>Sequence similarity values of 100% are indicated by '✓'. Values ≥98.0% concordant with the intended identification were scored as 'confident'; values of 80–98% were scored as tentative; and values ≤80% were scored as 'not identified'.

<sup>b</sup>Results for isolate G were not included in the analysis.

centres before the deadline, including seven that had submitted results for Distribution 1 (Table 3). All but one centre correctly identified all strains tested, and this centre only failed to identify one strain. Furthermore, only two centres reported identifications that were not considered 'confident'. One centre, which had sent personnel for training at HPA CfI, achieved an improved score.

**DNA sequencing platforms**

In the first distribution, seven of ten centres used ABI platforms, i.e., ABI Prism 310, ABI

377, ABI 3100, ABI 3700 or ABI 3730 Genetic Analyzers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The remainder used either the CEQ8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) or the MegaBACE DNA Sequencing Platform (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Similarly, in the second distribution, ten of the 12 participants used one of the ABI platforms listed above, one used the CEQ8000 Genetic Analysis System, and one used the MegaBACE DNA Sequencing Platform. There was no apparent difference in the sequence quality obtained with the different platforms.

**Table 3.** Results obtained with the second *Legionella* distribution<sup>a</sup>

Study code	Intended result	Species	Centre no.													No. achieving correct species identification
			2	6	8	9	11	13	15	17	18	19	20	21		
K	<i>L. bozemanii</i>		✓	✓	✓	✓	96.9	✓	80.9	✓	✓	99.8	✓	✓	12/12	
L	<i>L. longbeachae</i>		✓	✓	✓	✓	85.1	✓	96.4	✓	✓	✓	✓	✓	12/12	
M	<i>L. jordanis</i>		✓	99.8	✓	✓	95.2	✓	97.2	NT	✓	99.8	✓	✓	11/11	
N	<i>L. dumoffii</i>		✓	✓	99.5	✓	97.5	✓	98.9	✓	✓	99.3	99.8	✓	12/12	
O	<i>L. bozemanii</i>		✓	✓	✓	✓	95.5	99.8	99.1	✓	✓	98.9	✓	✓	12/12	
P	<i>L. pneumophila</i>		✓	99.5	✓	99.7	NT	99.5	90.5	98.7	✓	98.6	98.0	✓	11/11	
Q	<i>L. oakridgensis</i>		✓	✓	99.5	✓	94.4	✓	99.6	✓	✓	99.6	✓	✓	12/12	
R	<i>L. jamestowniensis</i>		99.5	99.8	99.4	99.6	Not identified (<80)	✓	99.3	NT	NT	✓	98.5	✓	9/10	
S	<i>L. pneumophila</i>		✓	✓	99.6	✓	NT	✓	✓	99.1	✓	✓	✓	✓	11/11	
T	<i>L. saintthelensis</i>		✓	✓	✓	✓	95.0	✓	98.9	✓	✓	NT	99.8	✓	11/11	
Centre score	Intended identification	Tentative	0/10	0/10	0/10	0/10	7/8	0/10	4/10	0/8	0/9	0/9	0/10	0/10		
		Confident	10/10	10/10	10/10	10/10	0/8	10/10	6/10	8/8	9/9	9/9	10/10	10/10		
		Combined score	10/10	10/10	10/10	10/10	7/8	10/10	10/10	8/8	9/9	9/9	10/10	10/10		

NT, not tested.

<sup>a</sup>Sequence similarity values of 100% obtained using *mip* are indicated by '✓'. Values ≥98.0% concordant with the intended identification were scored as 'confident'; values of 80–98% were scored as 'tentative'; and values ≤80% were scored as 'not identified'.

## DISCUSSION

It is now clear that genotypic methods are essential in order to identify all species of *Legionella*. Several such methods have been described, but sequencing of the *mip* gene currently appears to provide the best option. With increased use of DNA sequencing in microbiological laboratories, EQA schemes to monitor such techniques are essential to ensure competence. To our knowledge, the EQA scheme described in this report is the first such large-scale study to evaluate genotypic methods for bacterial species identification. The results obtained show clearly that identification of *Legionella* spp. by *mip* gene sequencing works well, and that most reference laboratories can get the correct (intended) answer. While it is acknowledged that best practice would be to include only well-characterised isolates in EQA panels, the mistake made in the inclusion of strain G served to illustrate that putative novel species can also be recognised using this method. The study also revealed that training in DNA sequencing is sometimes necessary, and that good quality training and increased experience lead to higher quality and more reliable results.

No single system is perfect, and it is acknowledged that one species, *Legionella geestiana*, is known not to amplify with the primers described above. Additional primers capable of amplifying the *mip* gene from *L. geestiana* have been described (e.g., 5'-GTNACNGTNGANTANAC-NGG together with Legmip\_r) [16], or another gene target, e.g., *rpoB* or *rnpB*, can be used [9,10]. Improvements to the current scheme are planned, in both the practical methodology and the analytical strategy. The reverse amplification primer described in the original method does not generate acceptable quality sequences consistently from all species; however, alternative strategies can be devised to circumvent this problem (B. Wullings, personal communication).

Currently, identification of an unknown strain with a species present in the database should provide a similarity score of 98–100% with a good-quality sequence. It is notable that although the majority of wild-type strains in the panels (17/20) had *mip* sequences identical to those of a strain contained in the database, the maximum similarity possible (100%) was clearly not obtained by the majority of participants; however, most correct identifications showed >98% simi-

larity. This suggests that the sequence text file used for identification contained errors or ambiguities, most likely following submission of an unedited or poorly edited sequence. In response to these studies, an automated sequence quality tool has been implemented, and this now helps to prevent such misidentification. Single chromatogram files can be uploaded directly, and the automated tool provides feedback on the quality of the submitted trace file, based on the phred algorithm [20,21], thus making the result less subject to interpretive bias, although a minimum length of 300 nucleotides is still recommended. The ability to upload forward and reverse sequence trace files is planned. As with all similar databases, there is also a requirement for active curation in order to add new profiles and information.

Genotypic identification of *Legionella* spp. is an essential requirement for reference laboratories. Standard protocols, dedicated identification libraries and online tools are valuable resources to help achieve this goal. It is anticipated that additional genes, including those coding for 16S rRNA, RpoB, RnpB and GroEL, will be added to the current identification system to aid in the polyphasic characterisation and identification of known and potential novel members of this genus. In addition, it is intended to augment the *Legionella* spp. *mip* database to include representatives of species with different sequence types (e.g., as above), together with relevant epidemiological information. Contribution of novel sequences or information relating to existing sequences in different geographical regions is welcomed by the curators.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank R. George and M. Struelens for critical reading of this manuscript. This work was supported, in part, by funding from the European Centre for Disease Prevention and Control (contract number ECD 368). Preliminary data from this study were presented at the 6th International Conference on *Legionella* (Chicago, IL, USA).

## REFERENCES

1. Harrison TG. *Legionella*. In: Borriello SP, Murray PR, Funke G, eds, *Topley & Wilson's microbiology & microbial infections*. London: Hodder Arnold, 2005; 1761–1785.
2. Park M, Yun ST, Kim MS, Chun J, Ahn TI. Phylogenetic characterization of *Legionella*-like endosymbiotic X-bacteria

- in *Amoeba proteus*: a proposal for 'Candidatus *Legionella jeonii*' sp. nov. *Environ Microbiol* 2004; **6**: 1252–1263.
3. Kuroki H, Miyamoto H, Fukuda K *et al.* *Legionella impletisoli* sp. nov. and *Legionella yabuuchiae* sp. nov., isolated from soils contaminated with industrial wastes in Japan. *Syst Appl Microbiol* 2007; **30**: 273–279.
  4. Benson RF, Thacker WL, Daneshvar MI, Brenner DJ. *Legionella waltersii* sp. nov. and an unnamed *Legionella* genomospecies isolated from water in Australia. *Int J Syst Bacteriol* 1996; **46**: 631–634.
  5. Salloum G, Meugnier H, Reyrolle M *et al.* Identification of *Legionella* species by ribotyping and other molecular methods. *Res Microbiol* 2002; **153**: 679–686.
  6. Van Belkum A, Struelens M, Quint W. Typing of *Legionella pneumophila* strains by polymerase chain reaction-mediated DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol* 1993; **31**: 2198–2200.
  7. 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**: 1215–1222.
  8. 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**: 1560–1567.
  9. Ko KS, Lee HK, Park M-Y *et al.* Application of RNA polymerase  $\beta$ -subunit gene (*rpoB*) sequences for the molecular differentiation of *Legionella* species. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 2653–2658.
  10. Rubin C-J, Thollessen M, Kirsebom LA, Herrmann B. Phylogenetic relationships and species differentiation of 39 *Legionella* species by sequence determination of the RNase P RNA gene *rnpB*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005; **55**: 2039–2049.
  11. Feddersen A, Meyer HG, Matthes P, Bhakdi S, Husmann M. GyrA sequence-based typing of *Legionella*. *Med Microbiol Immunol* 2000; **189**: 7–11.
  12. Liu H, Li Y, Huang X, Kawamura Y, Ezaki T. Use of the *dnaJ* gene for the detection and identification of all *Legionella pneumophila* serogroups and description of the primers used to detect 16S rDNA gene sequences of major members of the genus *Legionella*. *Microbiol Immunol* 2003; **47**: 859–869.
  13. De Gheldre Y, Maes N, Presti FL, Etienne J, Struelens M. Rapid identification of clinically relevant *Legionella* spp. by analysis of transfer DNA intergenic spacer length polymorphism. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 162–169.
  14. Ratcliff RM. The problem of complexity. In: Cianciotto NP, Abu Kwaik Y, Edelstein PH *et al.*, eds, *Legionella: state of the art 30 years after its recognition*. Washington, DC: ASM Press, 2006; 359–366.
  15. Harrison TG, Taylor AG, eds. *A laboratory manual for Legionella*. Chichester: Wiley, 1988.
  16. Ratcliff RM. Genetic and functional studies of the Mip protein of *Legionella*. PhD Thesis, University of Adelaide, 2000.
  17. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; **215**: 403–410.
  18. Stajich JE, Block D, Boulez K *et al.* The Bioperl Toolkit: perl modules for the life sciences. *Genome Res* 2002; **12**: 1611–1618.
  19. Katoh K, Misawa K, Kuma M, Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* 2002; **30**: 3059–3066.
  20. Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using *phred*. I. Accuracy assessment. *Genome Res* 1998; **8**: 175–185.
  21. Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using *phred*. II. Error probabilities. *Genome Res* 1998; **8**: 186–194.

# **Artículo 7**



## External Quality Assessment of a DNA Sequence-Based Scheme for Epidemiological Typing of *Legionella pneumophila* by an International Network of Laboratories<sup>∇</sup>

Baharak Afshar,<sup>1\*</sup> Norman K. Fry,<sup>1</sup> William Bellamy,<sup>1,2</sup> Anthony P. Underwood,<sup>2</sup> Timothy G. Harrison,<sup>1</sup> and Members of the European Working Group for *Legionella* Infections<sup>†</sup>

Respiratory and Systemic Infection Laboratory<sup>1</sup> and Statistics, Modelling, and Bioinformatics Department,<sup>2</sup> Health Protection Agency, Centre for Infections, London, United Kingdom

Received 30 April 2007/Returned for modification 17 July 2007/Accepted 1 August 2007

**We report the results of an international external quality assessment (EQA) program to assess the performance of laboratories in genotyping *Legionella pneumophila* isolates using the standard European Working Group for *Legionella* Infections sequence-based typing protocol. Three coded distributions of *L. pneumophila* isolates were sent to laboratories in 12, 14, and 20 countries, respectively. The data were returned by 11 of 16, 18 of 19, and 27 of 29 centers, respectively. Incomplete submission of data resulted in exclusion from certain aspects of the analyses. The number of centers achieving 100% score, for all loci tested, rose successively from 50% (5 of 10) for the first EQA distribution, to 56% (9 of 16) for the second EQA distribution, to 76% (19 of 25) for the third EQA distribution. A number of additional centers made only a few errors (one to three) in each distribution. Sequence data from the first two distributions were collected in flat text file format and using specially developed software, the sequence quality tool (SQT), in the third distribution. The SQT allows users to upload trace files in standard file formats, automates basecalling using phred and phrap software, contig assembly, trimming, and matching against a reference library. The program described here allow users an independent measure of sequence quality, and such schemes are vital in order to identify strengths and weakness in centers responsible for the generation of genotyping data in legionella outbreak investigation. The present study demonstrates that DNA sequence data can be highly reproducible but, when independently assessed, in practice frequently falls short of this goal. However, experience and training in the methodology results in increased performance.**

*Legionella* infection can vary from mild respiratory illness to acute life-threatening pneumonia and is acquired by inhalation or aspiration of legionellae from a contaminated environmental source. Molecular typing of clinical and epidemiologically linked environmental legionella isolates aids the identification of sources of disease and the subsequent prevention of further cases. Recently, the European Working Group for *Legionella*

Infections (EWGLI) described a consensus sequence-based typing (SBT) scheme and established an online database for the characterization of isolates of *L. pneumophila* (11, 12, 15) (<http://www.ewgli.org>). For this standardized method, defined regions of six genes (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, and *proA*) are amplified from genomic DNA, and PCR amplicons are sequenced using forward and reverse primers. Users then query the database to identify predesignated alleles and so determine the complete allelic profile comprising a string of the individual allele numbers (e.g., 1,4,3,1,1,1).

In the research setting the SBT method has been shown to be robust, to have excellent interlaboratory reproducibility, and to yield epidemiological concordant results. Using this methodology, isolates from cases of travel-associated legionellosis can be examined in one country, and the results can be compared directly with those obtained by coworkers investigating the likely environmental source and other linked cases in another country (3, 8, 20, 22, 23). The public health, political, and economic consequences can be significant, if the source of infection is wrongly attributed (e.g., a hotel is erroneously implicated). Therefore, it is essential for the investigating authorities to have confidence in quality of the typing data reported.

The aims of this international, multicenter study were to (i) assess the ability of national and regional reference laboratories to correctly type coded distributions of *L. pneumophila* isolates using the standard EWGLI SBT protocol and associ-

\* Corresponding author. Mailing address: Respiratory and Systemic Infection Laboratory, Health Protection Agency Centre for Infections, 61 Colindale Avenue, London NW9 5EQ, United Kingdom. Phone: 44 (0)208 3277103. Fax: 44 (0)208 2056528. E-mail: Baharak.Afshar@HPA.org.uk.

<sup>†</sup> The members of the European Working Group for *Legionella* Infections who participated in this study were as follows: A. Indra (Vienna, Austria), A. Deplano and O. Soetens (Brussels, Belgium), P. Tilley (Calgary, Alberta, Canada), K. Bernard, (Winnipeg, Manitoba, Canada), J. Bangsberg (Herlev, Denmark), S. Nielsen (Copenhagen, Denmark), J. Etienne (Lyon, France), S. Mentula (Helsinki, Finland), P. C. Lück (Dresden, Germany), L. Franzin (Turin, Italy), M. Scaturro, and P. Visca (Rome, Italy), J. Amemura-Mackawa (Tokyo, Japan), J. Mossong (Luxembourg, Luxembourg), J. P. Bruin (Haarlem, The Netherlands), K. van der Zwaluw (Bilthoven, The Netherlands), D. A. Caugant (Oslo, Norway), T. Marques (Lisbon, Portugal), D. S. Lindsay (Glasgow, Scotland), S. Blanco (Barcelona, Spain), C. Pelaz (Madrid, Spain), F. Fendukly (Stockholm, Sweden), B. Herrmann (Uppsala, Sweden), V. Gaia (Bellinzona, Switzerland), S. Lai (London, United Kingdom), and R. F. Benson (Atlanta, Georgia).

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 8 August 2007.

ated web-based tools and (ii) seek to remedy any deficiencies identified, by using a comprehensive external quality assessment (EQA) program.

#### MATERIALS AND METHODS

**Participants.** The first two EQA distributions were open to European laboratories who participate in the EWGLI microbiological studies. For the third distribution, non-European laboratories that had expressed an interest in the SBT methodology were also invited to participate. Participants from 16 centers representing 12 countries took part in the first distribution, 19 centers in 14 countries participated in the second, and 29 centers in 20 countries participated in the third. The majority of these centers act as a regional or national reference laboratory for *Legionella* infections. These studies were coordinated by the Respiratory and Systemic Infection Laboratory, Health Protection Agency Centre for Infections, London, United Kingdom.

**Bacterial isolates.** Clinical and environmental isolates were selected from the EWGLI culture collection for inclusion in three distributions. The first distribution comprised 11 *L. pneumophila* serogroup 1 (sg1) isolates of which three pairs of isolates were epidemiologically related; the second distribution comprised six *L. pneumophila* sg1 and four non-sg1 isolates, of which two pairs were epidemiologically related. The same epidemiologically related pair (EUL 048 and EUL 056) and an unrelated isolate (EUL 137) were included in the first and second distributions. The second distribution, also contained single locus variants (SLVs): the allelic profile of the epidemiologically related pair (3,10,1,28,14,9) was distinct from the allelic profile of an epidemiologically unrelated isolate at one locus (*pitE*) (3,13,1,28,14,9); the third distribution comprised five *L. pneumophila* sg1 isolates, of which a pair of isolates were epidemiologically related and another pair were SLVs. Isolates were coded prior to dispatch to blind the participants to their identity (Table 1). Replicates of each isolate were prepared on buffered charcoal yeast extract agar (Oxoid) slopes and then dispatched to each participant by courier. The first distribution was dispatched in August 2003, the second was dispatched in October 2004 and the third was dispatched in January 2006. With each distribution, the coordinating center provided detailed instructions for completion and submission of results.

(i) **First EQA distribution.** Each center was asked to examine the 11 coded *L. pneumophila* sg1 isolates (no. 1 to 11) using the standard SBT protocol described by Gaia et al. (12) for five of the six targets. One allele (*mompS*) had been shown to give occasional sequence ambiguity using the original primers (12); therefore, participants were instructed to use a different combination of primers for the primary PCR amplification of this locus (11).

**DNA sequence analysis.** Participants were instructed to generate consensus sequence of the correct length by aligning forward and reverse sequences against a reference sequence. The trimmed reference sequence for each allele was available for download from the EWGLI SBT database pages (<http://www.ewgli.org>). No specific software package was stipulated for contig assembly.

**Allele identification.** Alleles (submitted as flat text files) were identified by comparison of consensus sequences with the sequences of preexisting alleles held in the dedicated online EWGLI SBT database. The database returned an allele type, e.g., 1, when a submitted sequence showed a 100% match to a pre-designated allele type. Sequences with < 100% match were identified as the closest match to a preexisting allele type with the number of mismatches specified. Additionally bioinformatic algorithms supporting the database returned an alignment with mismatches highlighted.

**Reporting arrangements.** Results were submitted to the coordinating center by completing and returning a questionnaire indicating the SBT allelic profile for each coded isolate. This form also detailed other information such as the sequencing chemistry; sequencing platform; PCR thermocycler manufacturer and model; the DNA analysis software and version used for contig assembly.

**Scoring of participant results.** Analysis of submitted results was undertaken by the coordinating center and each participating center was provided with a report summarizing the results of the first survey. Participants were each given a confidential center number. Each intended allele for each isolate was scored as "1," incorrect alleles were scored as "0" (maximum score of 6 per isolate). The number of correct alleles for all isolates was calculated and expressed as a percentage. The inclusion of data for the *mompS* allele was considered optional; therefore, participants who only reported results for five alleles were scored out of 55, while those who examined all six were scored out of 66. Separately, participants were scored for the number of isolates for which they reported the intended allelic profile (maximum score of 11) and the number of epidemiologically related pairs which were given the same profile (maximum score of 3).

TABLE 1. Epidemiologically related and unrelated clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* serogroup 1 and non-serogroup 1 included in the three EQA distributions

Study code <sup>a</sup>	EUL <sup>b</sup> no.	Serogroup	Source <sup>c</sup>	SBT profile
<b>First EQA distribution</b>				
1	008	1	C	2,3,9,10,2,1
2	032	1	C	2,10,18,10,2,1
3	033	1	C	3,6,1,14,14,9
4	040	1	C	<b>11,14,16,1,15,13</b>
5	047	1	E	<b>11,14,16,1,15,13</b>
6	048	1	C	<b>5,2,22,27,6,10</b>
7	056	1	C	<b>5,2,22,27,6,10</b>
8	073	1	C	<b>3,4,1,1,14,9</b>
9	079	1	C	<b>3,4,1,1,14,9</b>
10	100	1	C	7,6,17,3,13,11
11	137	1	E	6,10,15,28,9,14
<b>Second EQA distribution</b>				
12 (11)	137	1	E	6,10,15,28,9,14
13*	153	6	C	3,13,1,28,14,9
14*	154	8	C	<b>3,10,1,28,14,9</b>
15*	155	8	E	<b>3,10,1,28,14,9</b>
16	156	10	C	2,10,3,28,9,4
17	157	1	E	1,4,3,1,1,1
18	048	1	C	<b>5,2,22,27,6,10</b>
19 (7)	056	1	C	<b>5,2,22,27,6,10</b>
20	025	1	C	4,8,11,10,10,12
21	121	1	C	4,7,11,3,11,12
<b>Third EQA distribution</b>				
22*	164	1	C	5,1,22,30,6,10
23	165	1	C	<b>3,4,1,1,14,9</b>
24	166	1	C	<b>3,4,1,1,14,9</b>
25*	167	1	C	5,1,22,10,6,10
26	168	1	C	5,10,22,15,6,2

<sup>a</sup> Epidemiologically related pairs are indicated in boldface. \*, SLV.

<sup>b</sup> EUL, European Union Legionella culture collection.

<sup>c</sup> C, clinical isolate; E, environmental isolate.

(ii) **Second EQA distribution.** Each participant was asked to examine 10 coded *L. pneumophila* (6 sg1 and 4 non-sg1) isolates (no. 12 to 21) using the revised SBT protocol (11). Participants were instructed to sequence at least four of the six targets for all isolates.

**DNA sequence analysis.** DNA sequence analysis was performed as described above for the first EQA distribution.

**Allele identification and reporting arrangements.** Allele identification and reporting arrangements were essentially as described for the first EQA distribution, but in addition the submitted alleles were captured online (as flat text files) for later review by the coordinating center. Participants also completed and returned their results via a questionnaire form as previously.

**Scoring of participant results.** Analysis of the submitted results was undertaken by the coordinating center as described for the first EQA distribution, except that for the second EQA study a global report on all results was also made available on the EWGLI website. Participants were scored as described previously, for sets of results returned via questionnaire, and for sets of results captured via web-based tools: the best set of results for each center was reported. Centers that only returned sequences from four genes were scored out of 40, those sequencing five genes were scored out of 50, and those sequencing all six genes were scored out of 60. Separately, participants were scored for the number of isolates for which they reported the intended allelic profile (maximum score of 10) and the number of epidemiologically related pairs which were given the same profile (score 2) and for correctly distinguishing the SLVs (score 1) (combined maximum score 3).

**Error analysis.** By review of the submitted text files, the coordinating center attempted to classify any incorrect allele designations into either process errors (PE) (e.g., the allele reported was present in an isolate in the panel but was



TABLE 2. Results from participating centers for the three EQA distributions<sup>a</sup>

Centre no.	First EQA distribution				Second EQA distribution				Third EQA distribution					
	Allele score		Profile score (11)	EC score (3)	Allele score		Profile score (10)	EC/SLV score (3)	Error	Allele score		Profile score (5)	EC/SLV score (2)	Error
	No.	%		No.	%				No.	%				
2	<b>66/66</b>	<b>100</b>	<b>11</b>	<b>3</b>	<b>60/60</b>	<b>100</b>	<b>10</b>	<b>3</b>	NA	<b>30/30</b>	<b>100</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	NA
3	<b>55/55</b>	<b>100</b>	<b>11</b>	<b>3</b>	<b>60/60</b>	<b>100</b>	<b>10</b>	<b>3</b>	NA	<b>30/30</b>	<b>100</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	NA
6	<b>66/66</b>	<b>100</b>	<b>11</b>	<b>3</b>	<b>60/60</b>	<b>100</b>	<b>10</b>	<b>3</b>	NA	<b>30/30</b>	<b>100</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	NA
11	<b>55/55</b>	<b>100</b>	<b>11</b>	<b>3</b>	56/60	93	7	1	PE	28/30	93	3	1	PE
16	<b>55/55</b>	<b>100</b>	<b>11</b>	<b>3</b>	58/60	97	8	2	PE	<b>30/30</b>	<b>100</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	NA
20	65/66	98	10	3	<b>60/60</b>	<b>100</b>	<b>10</b>	<b>3</b>	NA	29/30	97	4	1	PE
8	64/66	97	10	3	<b>60/60</b>	<b>100</b>	<b>10</b>	<b>3</b>	NA	29/30	97	4	1	PE
13	56/66	85	4	2	<b>60/60</b>	<b>100</b>	<b>10</b>	<b>3</b>	NA	<b>30/30</b>	<b>100</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	NA
9	52/55	95	8	2	56/60 <sup>b</sup>	93	10	2	NA					
15	47/66	71	0	1	56/60	93	8	1	PE/SE	<b>30/30</b>	<b>100</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	NA
7					<b>50/50</b>	<b>100</b>	<b>10</b>	<b>3</b>	NA					
12					<b>40/40</b>	<b>100</b>	<b>10</b>	<b>3</b>	NA	<b>30/30</b>	<b>100</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	NA
14					59/60	98	9	2	SE	<b>30/30</b>	<b>100</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	NA
18					58/60	97	8	3	PE	<b>30/30</b>	<b>100</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	NA
19					51/60	85	7	3	PE/SE	<b>30/30</b>	<b>100</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	NA
17					56/60	93	6	0	PE/SE					
1										<b>30/30</b>	<b>100</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	NA
22										<b>30/30</b>	<b>100</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	NA
23										<b>30/30</b>	<b>100</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	NA
24										<b>30/30</b>	<b>100</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	NA
25										<b>30/30</b>	<b>100</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	NA
26										<b>30/30</b>	<b>100</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	NA
27										<b>30/30</b>	<b>100</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	NA
29										<b>30/30</b>	<b>100</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	NA
30										<b>30/30</b>	<b>100</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	NA
5										29/30	97	4	1	PE
31										27/30	90	3	0	SE
4										19/30	63	0	0	SE

<sup>a</sup> Centres who achieved a score of 100% are indicated in boldface. EC, epidemiologically concordant. Two error classes were used: PE (e.g., the right allele attributed to the wrong isolate) and SE (e.g., an allele was identified which was novel or not in the EQA distribution). NA, not applicable.

<sup>b</sup> *mompS* was not tested for 4 of 10 isolates.

attributed to the wrong isolate due to isolate switching, clerical error, or mislabeling of DNA sequence trace files) or to DNA sequencing errors (SE) (e.g., due to low quality DNA sequence data or erroneous editing, such that an allele was reported that did not exist in the database or which did exist but was not represented by any isolate in the panel).

(iii) **Third EQA distribution.** Each participant was asked to test a panel of five *L. pneumophila* sg1 isolates (no. 22 to 26) using the SBT protocol described by Gaia et al. (11). Participants were instructed to amplify and sequence all six loci.

**DNA sequence analysis and allele identification.** Participants were asked to analyze their data in two ways; firstly, as described above for the first EQA distribution, and secondly, using a newly developed automated sequence quality tool (SQT) accessible via the EWGLI website (<http://www.ewgli.org>).

**SQT.** This online SQT uses a web-based interface accessible via any standard internet browser, e.g., Firefox (Mozilla) or Internet Explorer (Microsoft Corp.), thus providing ready access for both the user and curator(s) of a database. The web pages are constructed dynamically using the perl programming language and cgi functionality hosted on a UNIX-based web server (21). The design of the application allows users to upload forward and reverse trace files, in standard file format (\*.scf) (5) or ABI trace file format (\*.abi) (Applied Biosystems), for individual SBT alleles. The tool then attempts to carry out base-calling on the uploaded traces using Phred software (version 0.020425.c) (6, 7), assembles contig(s) from the traces using the Phrap software (version 0.990329) (14), finds start and end (reference) positions in the contig, trims the contig using these positions, and then matches the trimmed contig against the preexisting allele sequences in the SBT database to give either an exact match or a closest match with the number of mismatches between the closest match and the uploaded sequence. The tool also produces a sequence quality report for each uploaded contig and generates a six-figure allelic profile (e.g., 3,4,1,1,14,9), as well as indicating whether the obtained allelic profile is of a novel combination (21). The quality scores are logarithmically linked to error probabilities, as called by the Phred software.

**Scoring of participant results.** Analysis of submitted results was undertaken by the coordinating center as described for the second EQA distribution. Participants were scored as described previously (i.e., for results returned via questionnaire) and for results captured via the SQT: their best set of results was recorded. Centers were scored out of 30. Separately, participants were scored for the number of isolates for which they reported the intended allelic profile (maximum score of 5) and for giving the epidemiologically related pair the same (intended) profile and correctly distinguishing the SLVs (combined maximum score of 2).

**Error analysis.** Error analysis was as described for the second EQA distribution.

**DNA sequencing platform and data analysis software.** In these studies, DNA sequencing was performed "in-house" or using a commercial provider on one of the following sequencing platforms: an ABI 310, 3100, 377, or 3730 DNA genetic analysis system (Applied Biosystems); a CEO 8000 DNA analysis system (Beckman Coulter); or a Molecular Dynamics MegaBACE 1000 (Global Medical Instrumentation). Participants also used DNA analysis software, including BioNumerics and Kodon (Applied Maths), Bio-Edit (Ibis Therapeutics), ABI Prism AutoAssembler and SeqScape (Applied Biosystems), Lasergene editseq and megalin (DNASTAR), Chromas (Technelysium, Pty, Ltd.), Readseq (EMBL-EBI), Vector NTI (Invitrogen), or Align IR (LI-COR).

RESULTS

**First EQA distribution.** SBT results were obtained from 11 of 16 centers, one of which only tested two targets and therefore was excluded from further analysis. Five centers achieved the maximum score (100%), correctly identifying the allelic profile for the entire panel (two centers tested all six targets and three centers tested five targets) (Table 2). Of the remain-

ing centers, center 20 made a single error reporting one allele as "novel" (i.e., not found in the database); center 8 misidentified two alleles of isolate 1 reporting the profile as "2,3,9,10,1,5" instead of "2,3,9,10,2,1" (neither of the two misidentified alleles were represented elsewhere in the panel); center 13 reported an exact match to a predesignated allele type (included in the panel) for all of the targets tested (however, it misidentified the allelic profiles of 7 of 11 samples, presumably due to a "mix-up" of isolates or data labeling problems); center 9 obtained three errors, of which all were instances where "novel" alleles were reported; and center 15 recorded the lowest score (71%), submitting  $\geq 1$  error for all isolates. Seven of ten centers correctly identified the allelic profiles of the three pairs of epidemiologically related isolates, scoring 3/3 (Table 2).

**Second EQA distribution.** SBT results were received from 18 of 19 centers, of which 16 centers tested at least four targets for the entire panel (Table 2). The two centers submitting data from  $< 4$  loci were excluded from further analysis. Eight centers achieved the maximum score (100%), correctly identifying the allelic profile for the entire panel (six centers tested all six, one tested five, and one tested four loci), thirteen centers were able to correctly identify the allelic profiles of the two epidemiologically related sets, and twelve centers were able to differentiate between the SLV isolates. Center 9 correctly identified all 56 alleles they examined but only scored 93% (56 of 60) since they did not report results for the *mompS* locus for 4 of 10 isolates.

For centers that failed to achieve 100%, review of their submitted text files allowed the coordinating center to categorize each error as either a PE or SE. Centers 16 and 18 each made two PE (two alleles switched) and center 11 made four PE (two pairs of alleles switched). Centers 14, 15, 17, and 19 made one, four, four, and nine errors, respectively, most of which were SE. Four of the five centers that failed to achieve 100% in the first EQA distribution took part in this assessment and showed improved performance (three centers obtained a maximum score of 100%). It is noteworthy that the score from center 15, which had received training at the coordinating center between the two assessments, increased from 71 to 93%.

**Third EQA distribution.** Results were received from 27 of 29 centers, of which 25 had tested the six targets for the entire panel (Table 2). Of these 25 centers, 19 (76%) achieved a maximum score (100%), correctly identifying the allelic profile of all five isolates, including the related pair and the two SLVs. Of the remaining six centers, two centers correctly identified the epidemiologically related pair, and two centers were able to differentiate the two SLVs.

In this distribution participants used the SQT for data submission; thus, the coordinating center was able to review the submitted DNA sequence trace files to investigate the possible causes of the errors. Centers 5, 8, and 20 each made a single PE; center 11 made two PE. Only two centers made SE (centers 4 and 31 making 11 and 3 SE, respectively).

**Overall performance.** The overall performance scores improved on each successive EQA distribution: 50% (5 of 10) of participants achieved the maximum score for the first EQA, 56% (9 of 16, including center 9) for the second, and 76% (19 of 25) for the third. Nine centers reported valid sets of results for all three EQAs, of which three centers scored 100% (156 of

156 alleles correctly identified), two scored 99%, and one each scored 98, 96, 94, and 85%. Improvement in the performance of individual laboratories was most marked for center 15, whose score increased from 71 to 93 to 100%.

**DNA sequencing platforms.** The majority of centers participating in the present study used an ABI sequencing platform. However, there was no apparent difference in the sequences quality obtained with other platforms.

## DISCUSSION

Since the description of the first multilocus sequence typing scheme for *Neisseria meningitidis* in 1998 (17), the characterization of bacterial pathogens by comparison of their DNA sequence data has become widespread. The popularity of this approach is due mainly to the widely held view that it is "a portable, universal, and definitive method for characterizing bacteria" (16, 17). Indeed, it was these features that led members of EWGLI to develop a DNA sequence-based typing method for *L. pneumophila* which, after several iterations, has now been adopted as the standard typing method for this organism (11). However, to realize the full potential of DNA sequence-based typing methodologies, it is necessary for a laboratory to be able to consistently produce high-quality DNA sequence data. Although it is often assumed that this goal is easily achieved, there are few published studies that have explicitly addressed this issue (1, 19). Such studies have in the main have focused on clinical diagnostics for mutational or single nucleotide polymorphism analysis; there are few data on the external assessment of laboratory performance in DNA sequence analysis for typing of microorganisms (1, 2, 18), and these studies vary in the starting material used (e.g., isolate or DNA) and in the use of user-independent assessment of sequence quality. In this context the members of EWGLI felt it was imperative to establish an EQA scheme to assess their ability to reliably undertake SBT of *L. pneumophila*.

The first EQA distribution was distributed to 16 laboratories in August 2003, shortly after the SBT method was first reported (12). The fact that half the participants who returned data (5 of 10) scored 100% in the assessment clearly demonstrates that SBT can provide highly reproducible, unambiguous data. However, contrary to initial expectations, the other five laboratories did not achieve 100%, reporting between 1 and 19 incorrect, or invalid, alleles of the 55 or 66 they examined. Since the organizers had not anticipated that so many errors would be made, the EQA reporting system was not designed to collect data to determine the nature of these errors. Nevertheless, it appeared that while some problems were due to the actual process of the EQA itself (e.g., switching of isolate or data during analysis or reporting) some were undoubtedly due to technical problems, resulting in low-quality DNA sequence data. After this first EQA distribution, the coordinating center offered training and advice to some laboratories that had little previous experience of DNA sequencing, and EWGLI made some changes to the standard SBT protocol (11).

A larger number of laboratories ( $n = 19$ ), registered for the second EQA distribution (October 2004), including the 10 centers that returned results from the first distribution. In an attempt to differentiate the errors caused by the actual EQA process (herein called PE) from errors caused by poor tech-

nique (SE), for this assessment, in addition to the allelic profiles of the coded isolates, the actual DNA sequence flat text files used to assign alleles were also captured by the online database. Again, approximately half (9 of 16, including center 9) of the participants achieved a maximum score, but a substantial number did not. Review of the captured flat text files from these laboratories allowed the coordinating center to classify the type of errors made. For three participants (including two that had scored 100% in the first EQA), all of the errors made were PE, but for four laboratories DNA SE were the main cause.

It was clear from the results of these first two EQA distributions that, while in experienced hands the SBT is an excellent method, in less-experienced hands problems with DNA sequence quality are frequent. Of the few DNA sequencing methodologic studies reported, one of the most revealing statistics was that the association between laboratory performance and the number of sequencing assays per year was statistically significant (1).

After the second distribution described above, the original DNA sequence trace files were requested from several centers for review by the coordinating center (data not presented). Comparison of these trace files against the actual flat text files submitted to the database indicated that where a laboratory obtained a low-quality DNA sequence trace, either by using software or by manual editing, they generated an unambiguous, but erroneous, DNA sequence text file which, when submitted to the database, identified an incorrect or "novel" allele. In an attempt to remove this important source of user error, bespoke software was written, incorporating the well-established phred and phrap algorithms, to provide an online DNA SQT (21). Diverse data, in terms of sequence string length and quality of management data, were reported from the European Union-funded sequencing program EQUALseq by Ahmad-Nejad et al. (1). The authors of that study emphasized the need to edit sequence data in order to generate valuable information. Although this approach has merit if the user is experienced, our approach differs fundamentally by using dedicated software to remove user bias.

The third EQA distribution was distributed in January 2006. By this time, the use of the EWGLI SBT method had increased to the extent that, in addition to EWGLI laboratories, coworkers in Australia, Canada, Japan, and the United States were also using this methodology (3, 4, 13, 22, 23). Consequently, participation was invited from this wider group, and a smaller EQA panel of five isolates was distributed to 29 centers in 20 countries. In addition to asking participants to submit data via the online databases, they were asked to submit data via the new SQT. Overall, the results of this third EQA were very encouraging, with 19 of 25 (76%) of participants achieving the maximum score. Of the six participants that failed to achieve 100%, four each made a single PE resulting in duplication (one instance) or switching (three instances) of data. Only two participants had technical DNA sequence problems, and both of these participants have only limited experience with the SBT method. The use of the automated SQT by participants clearly helped improve overall performance by providing a uniform, objective, and standardized measure of DNA-sequence quality.

Results from these EWGLI multicenter EQA studies illustrate that SBT (together with the dedicated web-based tools) is

a rapid, robust, reproducible, and widely applicable method for the typing of *L. pneumophila*. It allows laboratories to distinguish with a high degree of discrimination between epidemiologically related and unrelated isolates and to transit these data with high fidelity between coworkers around the world. The degree of reproducibility achieved by some participants across the whole study is much higher than has been reported for any other method of typing *L. pneumophila* assessed by coded panels (9, 10). However, given the potential of the methodology and the consequences of reporting erroneous results, not all laboratories performed SBT to a high enough standard. Two problem areas stand out: inexperience and poor laboratory practice. Training of less-experienced laboratories was clearly beneficial in these studies (e.g., center 15, whose score increased from 71 to 100%), and we would strongly recommend that laboratories should not use the SBT method in real investigations until they have trained staff and have demonstrated competence (e.g., through participation in EQA schemes such as this). In some instances even highly experienced laboratories made errors, but these appeared to be due to poor laboratory practice (e.g., poor or illogically labeled DNA sequence files which become switched) rather than technical problems. Although it might be argued that some of these PE are artifacts of an EQA scheme, it should be remembered that investigations of legionellosis are typically undertaken at short notice with very tight deadlines, and it is in just such situations that simple errors are most likely to occur. One solution to this problem is to prepare "best practice" guidelines that provide, among other things, clear guidance of the logical designation of DNA sequence data filenames, but currently these are lacking. It should also be noted that the phred and phrap software are not able to analyze all sequence trace file formats. Thus, additional methods of ensuring the quality of sequence from such platforms are required.

Compared to DNA fragment-based techniques, such as pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism analysis, DNA sequencing offers much greater reproducibility. However, as the use of the SBT method increases, it is imperative to constantly improve and assess laboratory performance. We believe that EQA schemes, such as that described here, are essential, and indeed others have emphasized the call for mandatory participation in EQAs (1). Such participation should provide a greater degree of confidence in laboratories responsible for reporting microbiological genotyping data, particularly with its increasing use in medicolegal cases.

#### ACKNOWLEDGMENT

This study was supported in part by funding from the European Centre for Disease Prevention and Control (contract number ECD 368).

#### REFERENCES

- Ahmad-Nejad, P., A. Dorn-Beincke, U. Pfeiffer, J. Brade, W.-J. Geilenkeuser, S. Ramsden, M. Pazzagli, and M. Neumaier. 2006. Methodologic European external quality assurance for DNA sequencing: the EQUALseq program. *Clin. Chem.* 52:716-727.
- Aires-de-Sousa, M., K. Boye, H. de Lencastre, A. Deplano, M. C. Enright, J. Etienne, A. Friedrich, D. Harmsen, A. Holmes, X. W. Huijsdens, A. M. Kearns, A. Mellmann, H. Meunier, J. K. Rasheed, E. Spalburg, B. Strommenger, M. J. Struelens, F. C. Tenover, J. Thomas, U. Vogel, H. Westh, J. Xu, and W. Witte. 2006. High interlaboratory reproducibility of DNA sequence-based typing of bacteria in a multicenter study. *J. Clin. Microbiol.* 44:619-621.

3. Amemura-Maekawa, J., F. Kura, B. Chang, and H. Watanabe. 2005. *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from cooling towers in Japan form a distinct genetic cluster. *Microbiol. Immunol.* **49**:1027–1033.
4. Benson, R. F., C. E. Lucas, E. W. Brown, K. D. Cowgill, and B. S. Fields. 2006. Molecular comparison of isolates from a recurring outbreak of Legionnaires' diseases spanning 22 years, p. 139–142. *In* N. P. Cianciotto, Y. Abu Kwaik, P. H. Edelstein, B. S. Fields, D. F. Geary, T. G. Harrison, C. A. Joseph, R. M. Ratcliff, J. E. Stout, and M. S. Swanson (ed.), *Legionella: state of the art 30 years after its recognition*. ASM Press, Washington, DC.
5. Dear, S., and R. Staden. 1992. A standard file format for data from DNA sequencing instruments. *DNA Seq.* **3**:107–110.
6. Ewing, B., L. Hillier, M. C. Wendl, and P. Green. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* **8**:175–185.
7. Ewing, B., and P. Green. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* **8**:186–194.
8. Fry, N. K., B. Afshar, G. Wewalka, and T. G. Harrison. 2006. Epidemiological typing of *Legionella pneumophila* in the absence of isolates, p. 152–155. *In* N. P. Cianciotto, Y. Abu Kwaik, P. H. Edelstein, B. S. Fields, D. F. Geary, T. G. Harrison, C. A. Joseph, R. M. Ratcliff, J. E. Stout, and M. S. Swanson (ed.), *Legionella: state of the art 30 years after its recognition*. ASM Press, Washington, DC.
9. Fry, N. K., S. Alexiou-Daniel, J. M. Bangsberg, S. Bernander, M. Castellani-Pastoris, J. Etienne, B. Forsblom, V. Gaia, J. H. Helbig, D. S. Lindsay, P. C. Lück, C. Pelaz, S. A. Uldum, and T. G. Harrison. 1999. A multicenter evaluation of genotypic methods for the epidemiologic typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1: results of a pan-European study. *Clin. Microbiol. Infect.* **5**:462–477.
10. Fry, N. K., J. M. Bangsberg, S. Bernander, J. Etienne, B. Forsblom, V. Gaia, P. Hasenberger, D. Lindsay, A. Papoutsis, C. Pelaz, M. Struelens, S. A. Uldum, P. Visca, and T. G. Harrison. 2000. Assessment of intercenter reproducibility and epidemiological concordance of *Legionella pneumophila* serogroup 1 genotyping by amplified fragment length polymorphism analysis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**:773–780.
11. Gaia, V., N. K. Fry, B. Afshar, P. C. Lück, H. Meunier, J. Etienne, R. Peduzzi, and T. G. Harrison. 2005. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.* **43**:2047–2052.
12. Gaia, V., N. K. Fry, T. G. Harrison, and R. Peduzzi. 2003. Sequence-based typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 offers the potential for true portability in legionellosis outbreak investigation. *J. Clin. Microbiol.* **41**:2932–2939.
13. Gilmour, M. W., K. Bernard, D. M. Tracz, A. B. Olson, C. R. Corbett, T. Burdz, B. Ng, D. Wiebe, G. Broukhanski, P. Boleszczuk, P. Tang, F. Jamieson, G. Van Domselaar, F. A. Plummer, and J. D. Berry. 2007. Molecular typing of a *Legionella pneumophila* outbreak in Ontario, Canada. *J. Med. Microbiol.* **56**:336–341.
14. Gordon, D., C. Abajian, and P. Green. 1998. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res.* **8**:195–202.
15. Harrison, T. G., N. K. Fry, B. Afshar, W. Bellamy, N. Doshi, and A. P. Underwood. 2006. Typing of *Legionella pneumophila* and its role in elucidating the epidemiology of Legionnaires' disease, p. 94–99. *In* N. P. Cianciotto, Y. Abu Kwaik, P. H. Edelstein, B. S. Fields, D. F. Geary, T. G. Harrison, C. A. Joseph, R. M. Ratcliff, J. E. Stout, and M. S. Swanson (ed.), *Legionella: state of the art 30 years after its recognition*. ASM Press, Washington, DC.
16. Maiden, M. C. 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**:561–588.
17. Maiden, M. C. J., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman, and B. G. Spratt. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:3140–3145.
18. Neal, S., B. Beall, K. Ekelund, B. Henriques-Normark, A. Jasir, D. Johnson, E. Kaplan, M. Lovgren, R. R. Reinert, A. Efstratiou, et al. 2007. International quality assurance study for characterization of *Streptococcus pyogenes*. *J. Clin. Microbiol.* **45**:1175–1179.
19. Patton, S. J., A. J. Wallace, and R. Elles. 2006. Benchmark for evaluating the quality of DNA sequencing: proposal from an international external quality assessment scheme. *Clin. Chem.* **52**:728–736.
20. Scaturro, M., M. Losardo, G. De Ponte, and M. L. Ricci. 2005. Comparison of three molecular methods used for subtyping of *Legionella pneumophila* strains isolated during an epidemic of legionellosis in Rome. *J. Clin. Microbiol.* **43**:5348–5350.
21. Underwood, A. P., W. Bellamy, B. Afshar, N. K. Fry, and T. G. Harrison. 2006. Development of an online tool for the European Working Group for Legionella Infections sequence-based typing, including automatic quality assessment and data submission, p. 163–166. *In* N. P. Cianciotto, Y. Abu Kwaik, P. H. Edelstein, B. S. Fields, D. F. Geary, T. G. Harrison, C. A. Joseph, R. M. Ratcliff, J. E. Stout, and M. S. Swanson (ed.), *Legionella: state of the art 30 years after its recognition*. ASM Press, Washington, DC.
22. Wong, S., K. Pabbaraju, V. F. Burk, G. C. Broukhanski, J. Fox, T. Louie, M. W. Mah, K. Bernard, and P. A. G. Tilley. 2006. Use of sequence-based typing for investigation of a case of nosocomial legionellosis. *J. Med. Microbiol.* **55**:1707–1710.
23. Young, M. K., H. V. Smith, B. Gray, B. Huang, J. Barten, C. Towner, S. Plowman, B. Afshar, N. K. Fry, B. Blair, J. Savill, and B. J. McCall. 2005. The public health implications of a sporadic case of culture-proven Legionnaires' disease. *Aust. N. Z. J. Public Health* **29**:513–517.

# **AGRADECIMIENTOS**

---



## **AGRADECIMIENTOS**

*Cualesquiera que hayan sido nuestros logros,  
alguien nos ayudó siempre a alcanzarlos.  
Althea Gibson*

Cuando uno cree haber finalizado el trabajo de tantos años, no puede olvidar que siempre le queda algo más por hacer. Para mí resulta ser la parte más gratificante en la que puedo expresar aquello que muchas veces por parecer obvio no se dice y que quizás habría que tratar de decir más a menudo: GRACIAS.

Al volver la vista atrás, recuerdo momentos buenos y otros que no lo fueron tanto, pero en todos ellos siempre tuve a alguien a mi lado con quien compartirlos.....y a todos ellos van dedicadas estas palabras.

Gracias a Jose por su constancia, enseñanzas, infinita paciencia y su amistad.

Al Dr. Ausina por su confianza durante todos estos años.

A Cristina por su energía, vitalidad, confianza y ayuda en todo momento y enseñarnos que "son pacientes, no muestras".

A los compañeros de laboratorio de los inicios que actualmente están trabajando en otros sitios como Núria y Pablo.

A Gema con la que he compartido muchos momentos, charlas, proyectos y muchas, muchas risas y copas.

A Irene, Alicia, Nerea y Loreto por toda la ayuda incondicional que me han dado siempre y los buenos momentos dentro y fuera del laboratorio. Por ser como son, mis amigas.

A los técnicos de la gran sección "*Respiratorio-BK-Antígenos*", Miguel Ángel, Miguel, Lucía y Loli (en su momento), por tantas detecciones de antígeno y por ayudarme a buscar muestras perdidas en algún congelador.

A las secretarías del laboratorio especialmente a Belén por las risas que nos echamos y a Cristina Marcos por su ayuda en la última fase de esta tesis.

A todos mis compañeros del Servicio de Microbiología, en general, no me gustaría dejarme a nadie, pero en especial a toda la gente con lo que la colaboración ha sido más estrecha. A todos las "becarias" en especial a Elisa y Vicky con las cuales hemos compartido tantos momentos, a todos los adjuntos, técnicos y Montse Morilla que siempre está dispuesta para conseguir cualquier cosa que necesites.

A todos mis amigos de ahora y de toda la vida. A Cristina, Eva, Ana, Leo, kpi, los montañeros, los salseros....., que desde Holanda, Estambul o cualquier parte del mundo nunca han dejado de enviarme su cariño.

A mis padres y a mi hermana Laura, por su apoyo incondicional, no sólo por conseguir esta meta, si no por estar siempre. A Nectari, los Antonios y María. Y especialmente, a mis abuelos que ya no están pero siempre estarán presentes.